

IDENTIFICACIÓN DE MICRODELECCIONES Y MICRODUPLICACIONES ASOCIADAS A  
LA APARICIÓN DE TETRALOGÍA DE FALLOT EN INDIVIDUOS DEL SUR OCCIDENTE  
COLOMBIANO

FELIPE RUIZ BOTERO, MD



UNIVERSIDAD DEL VALLE  
FACULTAD DE SALUD  
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA  
Santiago de Cali, 2018

IDENTIFICACIÓN DE MICRODELECIONES Y MICRODUPLICACIONES ASOCIADAS A  
LA APARICIÓN DE TETRALOGÍA DE FALLOT EN INDIVIDUOS DEL SUR OCCIDENTE  
COLOMBIANO

FELIPE RUIZ BOTERO, MD  
CODIGO: 201402557

Director Trabajo de Grado  
Harry Pachajoa, MD, PhD

Co-Directora Trabajo de Grado  
Carolina Isaza de Lourido, MD, MSc.

Trabajo de Investigación para optar por el título de  
Magíster en Ciencias  
Biomédicas

UNIVERSIDAD DEL VALLE  
FACULTAD DE SALUD  
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA  
Santiago de Cali, 2018

Nota de aceptación:

Aprobado por el Comité de  
grado en cumplimiento de los  
requisitos exigidos por la  
Universidad del Valle para el  
optar por el título de Magíster  
en Ciencias Biomédicas.

---

---

---

---

Presidente del Jurado

---

Jurado No. 1

---

Jurado No. 2

---

Jurado No. 3

---

Fecha de sustentación  
(Ciudad, día, mes y año)

## **DEDICATORIA**

Dedico esta obra a mi familia,

A mi señora Isabel, quien me ofreció su apoyo, compañía incondicional y paciencia a lo largo de este proyecto. A mis maestros, La Dra. Carolina Isaza y Dr. Harry Pachajoa, quienes siempre me han ofrecido su guía y enseñanza durante mi desarrollo profesional y personal. A mis padres y mi tía Nena, quienes con su sacrificio me ofrecieron mi educación. A todo el equipo del CIACER por su ayuda, particularmente a lo largo de los procesos realizados en el laboratorio de genética; y a Eddie y Spike , por dejarme trabajar en la casa.....ocasionalmente.



## **AGRADECIMIENTOS**

Extiendo agradecimientos a todo el equipo del Centro de Investigaciones en Anomalías Congénitas y Enfermedades Raras (CIACER), y al personal de la facultad de salud de la Universidad Icesi.

A La Dra. Lisa Rodríguez, y otros especialistas en las áreas de genética médica y cardiología pediátrica, así como a todo el equipo del Laboratorio Clínico y de diagnóstico molecular de la Fundación Valle del Lili.

A el Dr. Julián Nevado y Dr. Pablo lapunziña del Hospital Universitario La Paz en Madrid España, por su orientación y guía.

Sobre todo, un especial agradecimiento a los pacientes participantes, sin ustedes este proyecto no habría sido posible.

## CONTENIDO

Dedicatoria.....	4
Agradecimientos.....	5
Contenido.....	6
Listado de Tablas.....	9
Listado de figuras.....	11
Listado de símbolos y abreviaturas.....	12
Listado de anexos.....	15
Glosario.....	16
1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVES	
1.1. Español.....	22
1.2. Inglés.....	25
2. INTRODUCCIÓN.....	27
2.1. Planteamiento del problema.....	27
2.2. Pregunta de investigación.....	32
2.3. Justificación.....	32
3. MARCO TEÓRICO.....	34
3.1. Epidemiología de las cardiopatías congénitas.....	34
3.2. Conceptos contemporáneos en la cardiogénesis.....	37
3.3. Campos cardiogénicos.....	42
3.4. Cresta neural y contribución proepicárdica.....	48
3.5. Tubo cardiogénico primitivo.....	50
3.6. Bucle cardíaco.....	54
3.7. Especificación del miocardio cardíaco.....	57
3.8. Desarrollo de las cámaras cardíacas.....	62
3.9. Desarrollo del marcapasos y Sistema de conducción cardíaco .....	68
3.10. Trabeculación el miocardio ventricular.....	73
3.11. Regulación epigenética del desarrollo cardíaco.....	75
3.12. Generalidades de la tetralogía de Fallot.....	81
3.13. Anatomía de la tetralogía de Fallot.....	83
3.13.1. Defecto del tabique interventricular.....	85
3.13.2. Estenosis pulmonar.....	87

3.13.3.	Dextraposición de la aorta.....	90
3.13.4.	Hipertrofia ventricular derecha.....	93
3.14.	Anomalías asociadas a tetralogía de Fallot.....	96
3.15.	Causas etiológicas de la tetralogía de Fallot.....	100
3.16.	Cromosomopatías asociadas a tetralogía de Fallot.....	102
3.16.1.	Trisomías.....	102
3.16.2.	Deleciones y duplicaciones.....	105
3.17.	Alteraciones monogénicas asociadas a tetralogía de Fallot.....	109
3.18.	Factores epigenéticos asociados a tetralogía de Fallot.....	118
3.19.	Factores ambientales asociados a tetralogía de Fallot.....	126
4.	Objetivos.....	129
4.1.	Objetivo general.....	129
4.2.	Objetivos específicos.....	129
5.	Metodología.....	131
5.1.	Objetivo 1.....	131
5.2.	Objetivo 2.....	132
5.3.	Objetivo 3.....	134
5.4.	Criterios de inclusión.....	136
5.5.	Criterios de exclusión.....	136
5.6.	Consideraciones éticas.....	137
5.7.	Análisis estadístico.....	137
6.	Resultados.....	138
6.1.	Resultado Cariotipo bandeo G.....	145
6.2.	Resultado amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples 22q11.....	147
6.3.	Resultado Hibridación Genómica Comparativa Array.....	149
7.	Discusión.....	155
7.1.	Alteraciones cromosómicas detectadas por cariotipo bandeo G.....	155
7.2.	Hallazgos amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples 22q11.....	159
7.3.	Hallazgos encontrados mediante Hibridación Genómica Comparativa Array.....	162
7.3.1.	Paciente con síndrome por delección 19p13.3 .....	166
7.3.2.	Paciente con síndrome por duplicación 9q34.3 .....	168
7.3.3.	Paciente con síndrome por delección 18p .....	171
7.3.4.	Pacientes con variantes de copia numérica en regiones asociadas a tetralogía de Fallot.....	173
7.3.4.1.	Pacientes con ganancia 1p36.3 .....	175

7.3.4.2. Pacientes con ganancia 8q24.3 .....	176
7.3.4.3. Pacientes con ganancia 16q24 .....	179
7.3.5. Pacientes con variantes de copia numérica específicas.....	180
7.3.6. Otros hallazgos Hibridación Genómica Comparativa Array .....	186
8. Conclusiones.....	193
9. Referencias .....	198
10. Anexos.....	244
10.1. Procedimiento operativo estandarizado de amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación (MLPA).....	244
10.2. Imágenes resultados amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación (MLPA).....	248

## LISTADO TABLAS

- Tabla 1. Anomalías cardiovasculares asociadas a tetralogía de Fallot.....99
- Tabla 2. Caracterización clínica y cardíaca de síndromes asociados a tetralogía de Fallot.....115
- Tabla 3. Genes asociados a tetralogía de Fallot no sindrómica.....117
- Tabla 4. Genes OMIM asociados a tetralogía de Fallot.....117
- Tabla 5. microRNAs asociados a la presencia de tetralogía de Fallot.....125
- Tabla 6. Patologías identificadas durante la gestación.....143
- Tabla 7. Resultados Cariotipo bandeado G.....146
- Tabla 8. Resultados amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA) para delección 22q11 ..... 148
- Tabla 9. Resultados Hibridación Genómica Comparativa Array..... 152
- Tabla 10. Descripción ecocardiografía pacientes con delección 22q11.....161
- Tabla 11. Hallazgos Hibridación Genómica Comparativa Array asociados a la presencia de tetralogía de Fallot.....163
- Tabla 12. variantes de copia numérica en regiones asociadas a tetralogía de Fallot.....174
- Tabla 13. Variantes de copia numérica específicas asociadas a tetralogía de Fallot.....185
- Tabla 14. Variantes de copia numérica identificadas por hibridación genómica comparativa en pacientes con delección 22q11.....189

- Tabla 15. Hallazgos causales de tetralogía de Fallot en la población  
estudiada.....196

## LISTADO FIGURAS

- Figura 1. Inducción molecular de células progenitoras.....	41
- Figura 2. Reguladores moleculares y distribución de los campos cardiogénicos en el tubo cardiogénico primitivo.....	45
- Figura 3. Vía de regulación molecular de los campos cardiogénicos.....	46
- Figura 4. Vía de regulación molecular del campo cardiogénico secundario.....	47
- Figura 5. Formación Tubo cardiogénico primitivo.....	52
- Figura 6. Bucle cardíaco.....	55
- Figura 7. Vía de diversificación células cardiovasculares.....	61
- Figura 8. Diferenciación miocardio de cámara.....	61
- Figura 9. Modelo haz atrioventricular y especificación sistema de conducción.....	71
- Figura 10. Autopsia corazón con tetralogía de Fallot.....	84
- Figura 11. Defecto del tabique interventricular.....	87
- Figura 12. Estenosis pulmonar.....	89
- Figura 13. Cabalgamiento de aorta.....	92
- Figura 14. Hipertrofia ventricular derecha.....	96
- Figura 15. Reclutamiento de pacientes.....	140
- Figura 16. Pacientes procesados mediante hibridación genómica comparativa array.....	150

## **LISTADO DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS**

ANF: Factor natriurético atrial.

Array CGH: Hibridación genómica comparativa.

ASD: Defectos del septum atrial.

AVCD: Defectos del canal atrioventricular.

AVSD: Defectos del septum atrioventricular.

$\beta$ -MHC: Cadena pesada  $\beta$ -miosina.

BAF: Factor asociado a Brg1/Brm.

BMP: Proteína morfogenética ósea.

CHD: Cardiopatías congénitas.

CIA: Comunicación interauricular

CIE-10: Clasificación Internacional de Enfermedades 10<sup>o</sup> revisión.

CIV: Comunicación interventricular.

CNV: Variante de copia numérica.

CoA: Coartación de aorta.

Cx40: Conexina 40.

Cx43: Conexina 43.

Dkk1: Dickkopf1.

DSCAM: Molécula de adhesión celular de síndrome de Down.

ECLAMC: Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas.

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos.

FISH: Inmunofluorescencia In situ.

HAT: Histona acetiltransferasa.

HDACs: Histona deacetilasas.

HDACA4: Inhibidor de la expresión génica de musculo esquelético.



HMG: Grupo de proteínas nucleares de alta movilidad.

HTA: Hipertensión arterial.

IGH: Región asociada con cadena pesada inmunoglobulina.

INS: Instituto Nacional de Salud.

ISCA: Genes International Symposium of Cytogenomic Arrays.

ITU: Infección tracto urinario.

IVU: Infección de las vías urinarias.

LINE-1: Elementos nucleares dispersos largos – 1.

Mef2: Factor potenciador específico de miocitos.

Mesp 1: Factor de transcripción básico hélice-bucle-hélice mesodermo posterior 1.

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.

MHC1: Cadena pesada de miosina 1.

miRs: MicroARN.

MLPA: Amplificación Múltiple de Sondas Dependientes de Ligación.

Nkx2.5: Factor de transcripción homeobox clase NK.

Nrg1: Neuregulina–1.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man.

PFKL: Fosfofructoquinasa tipo hepática

PHF: Campo cardiogénico primario.

POE: Procedimiento Operativo Estandarizado.

RAR: Receptores de ácido retinoico

RefSeq: Reference Sequence.

RNV: Recién nacidos vivos.

RXR: Receptor X retinoide

RYVEMCE: Registro y Vigilancia Epidemiológica de Malformaciones Congénitas Externas.

SAP: Sistema de gestión de historias clínicas.

SDF1: Factor derivado de células estromales-1.  
SHF: Campo cardiogénico secundario.  
SHH: Sonic hedgehog.  
SIVIGILA: Sistema de Vigilancia en Salud Pública.  
SRF: Factor de respuesta a suero.  
TGF: Factor de crecimiento transformante.  
TOF: Tetralogía de Fallot.  
USA: Estados Unidos.  
UTR: Regiones no traducidas.  
VCAM: Moléculas de adhesión vascular 1.  
VEGF: Factor de crecimiento vasculoendotelial.  
VSD: Defectos del septum ventricular.  
Whsc1: Metiltransferasa del candidato 1 del síndrome Wolf –Hirschhorn.

## **ANEXOS**

- Anexo #1: Procedimiento operativo estandarizado de amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación (MLPA).....244
- Anexo #2: Imágenes resultados amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación (MLPA).....248

## GLOSARIO

**Alelo:** Es cada una de las formas alternativas que puede tener un mismo gen que se diferencian en su secuencia y que se puede manifestar en modificaciones concretas de la función de ese gen.

**Alteraciones monogénicas/ Enfermedades monogénicas:** Son enfermedades hereditarias causadas por la mutación o alteración en la secuencia de ADN de un solo gen.

**Amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación:** Método semicuantitativo para el análisis selectivo de los cambios en el número de copias del ADN. Esta técnica utiliza una variación de la reacción en cadena de polimerasa multiplex, que permite que múltiples objetivos puedan ser amplificados con solamente un par de primers.

**Aneuploidias cromosómicas:** Es una alteración cromosómica de tipo numérica en donde la cantidad de cromosomas presentes en una célula u organismo difieren de su forma salvaje. En seres humanos se consideran los casos en donde el número de cromosomas es diferente a 46 ( $2n$ ). Este grupo de alteraciones no incluye las diferencias de sets completos cromosómicos (múltiplos de  $n$ ).

**Anomalías congénitas:** Se trata de alteraciones estructurales o funcionales, como los trastornos metabólicos, que ocurren durante la vida intrauterina y se detectan durante el embarazo, en el parto o en un momento posterior de la vida.

**Anomalías congénitas mayores:** Son Anomalías congénitas que comprometen significativamente el funcionamiento corporal, reducen la expectativa de vida y requieren intervenciones tempranas y ocasionalmente de urgencias para su manejo.

**Anomalías congénitas menores:** Son Anomalías congénitas que no comprometen significativamente el funcionamiento corporal, no tienen impacto sobre la expectativa de vida, y en la mayoría de casos su compromiso es de carácter estético.

**Anomalías cromosómicas / cromosomopatías:** Son alteraciones en el número o en la estructura de los cromosomas.

**Bucle cardiaco:** Estadio de la cardiogénesis en donde se da el plegamiento del tubo cardiogénico primitivo.

**Campo cardiogénico:** Espacio en donde se localizan las células progenitoras cardiacas en el mesodermo esplácnico al inicio de la cardiogénesis.

**Cardiogénesis:** Proceso del desarrollo embriológico del corazón.

**Cardiopatías congénitas:** Alteraciones del corazón y los grandes vasos que se originan antes del nacimiento.

**Cariotipo:** Es el patrón cromosómico de una especie expresado a través de un código, establecido por convenio, que describe las características de sus cromosomas.

**Células progenitoras cardiacas:** Grupo de células de origen epiblastico encargadas del desarrollo del corazón.

**Citogenética:** Campo de la genética que comprende el estudio de la estructura, función y comportamiento de los cromosomas.

**Cresta neural:** Una estructura discreta que existe transitoriamente en etapas tempranas del desarrollo embrionario de vertebrados. La población de células que

conforman la cresta neural son de carácter migratorio multipotencial que contribuyen a un amplio rango de derivados de los embriones de vertebrados.

**Defecto septum atrial/ Comunicación interauricular:** Cardiopatía congénita caracterizada por la presencia de defectos en tabique interauricular.

**Defecto del septum atrioventricular:** Cardiopatía congénita caracterizada por la presencia de defectos en tabique atrioventricular.

**Defecto septum ventricular/ Comunicación interventricular:** Cardiopatía congénita más frecuente, caracterizada por el cierre inadecuado del tabique interventricular.

**Deleciones:** Tipo especial de anomalía estructural cromosómica que consiste en la pérdida de un fragmento de ADN de un cromosoma.

**Dextraposición de la aorta/ cabalgamiento de la aorta:** Cardiopatía congénita donde la aorta se posiciona directamente sobre un defecto ventricular septal, en vez de sobre el ventrículo izquierdo.

**Ductus arterioso persistente:** Es la persistencia, después del nacimiento, de la comunicación que normalmente existe entre el sistema arterial pulmonar y la aorta durante la vida fetal, denominada ductus arteriosus.

**Duplicaciones:** Tipo especial de anomalía estructural cromosómica que consiste en la repetición de un fragmento de ADN a continuación del fragmento original en un cromosoma.

**Enfermedad multifactorial:** Las enfermedades multifactoriales también son llamadas poligénicas, son patologías causadas por la influencia combinada de diferentes factores ambientales y alteraciones en varios genes.

**Epigenética:** Estudio de elementos funcionales que regulan la expresión génica de una célula sin alterar la secuencia de ADN.

**Estenosis pulmonar:** Trastorno de válvula cardíaca, caracterizada por el estrechamiento de la válvula pulmonar.

**Fenotipo:** Hace referencia a los rasgos observables de un individuo, que ocurren como resultado de la interacción de su genotipo y el ambiente.

**Gen:** Secuencia de ADN que codifica un producto funcional. Es la unidad molecular de la herencia genética.

**Genoma:** La totalidad del material genético que posee un organismo o una especie en particular.

**Genómica:** Conjunto de disciplinas que estudian los genes, su funcionamiento, alteraciones y aplicaciones en la terapia génica moderna.

**Genotipo:** Información genética de un organismo.

**Haplotipo:** Grupo de genes de un organismo heredados de un solo padre.

**Heterocigoto:** Se refiere a la composición genética de una característica específica en un organismo diploide, en donde los alelos heredados para ese gen en particular son diferentes.

**Hibridación genómica comparativa :** Es un método de citogenética molecular para analizar las variaciones en el número de copias (CNV) en relación con el nivel de ploidía del ADN de una muestra en comparación con una muestra de referencia.

**Hipertrofia ventricular:** Enfermedad que consiste en un aumento del grosor del músculo cardíaco (miocardio) que conforma la pared ventricular.

**Homocigoto:** Se refiere a la composición genética de una característica específica en un organismo diploide, en donde los alelos heredados para ese gen en particular son iguales.

**Incidencia:** Número de casos nuevos de una enfermedad en una población determinada y en un periodo determinado.

**MicroARN:** es un ARN monocatenario, no codificante, con una longitud entre 21 y 25 nucleótidos, que tiene la capacidad de regular la expresión de otros genes.

**Microdelección:** Delección cromosómica que puede abarcar varios genes, menor a 5 millones de pares de bases (5 Mb), o que debido a su tamaño pequeño no son detectadas mediante métodos convencionales citogenéticos o cariotipo de alta resolución.

**Microduplicación:** Ganancia cromosómica que puede abarcar varios genes, que debido a su tamaño pequeño no es detectada mediante métodos convencionales citogenéticos o cariotipo de alta resolución.

**Monosomías:** Anomalía cromosómica caracterizada por la pérdida de un cromosoma, produciendo un complemento cromosómico  $2n - 1$

**Mosaico:** alteración genética en la que, en un mismo individuo, coexisten dos o más poblaciones de células con distinto genotipo (dos o más líneas celulares), originadas a partir de un mismo cigoto.

**Mutación:** Es la alteración permanente de la secuencia de nucleótidos del genoma de un organismo vivo.



**Prevalencia:** Proporción de individuos de un grupo o una población que presentan una característica o evento determinado en un momento o en un período determinado.

**Síndrome:** Patologías con grupo de signos y síntomas (anomalías congénitas) característicos, los cuales todos se explican por una causa etiología común.

**Tetralogía de Fallot:** Cardiopatía congénita cianosante, caracterizada por la presencia de cuatro malformaciones que dan lugar a la mezcla de sangre arterial con sangre venosa.

**Trisomías:** Anomalía cromosómica caracterizada por la ganancia de un cromosoma, produciendo un complemento cromosómico  $2n + 1$ .

**Tubo cardiogénico primitivo:** Nombre que recibe el corazón primitivo formado a partir del día 19 del desarrollo embrionario, que se caracteriza por su aspecto tubular.

**Variantes de copia numérica:** Se refiere al rasgo genético que involucra la cantidad de copias de un gen particular, presente en el genoma de un individuo. Las variantes genéticas, incluidas las inserciones, deleciones y duplicaciones de segmentos de ADN, también se denominan colectivamente variantes de copia numérica.

## 1.1. RESUMEN

**Introducción:** las cardiopatías congénitas son todos los defectos estructurales o funcionales del corazón que se encuentran presentes al momento del nacimiento. Estos defectos se originan por la formación anormal del corazón o de los grandes vasos sanguíneos, presentando una incidencia mundial que varía entre 8 a 75 por cada 1000 recién nacidos vivos. De estas condiciones la tetralogía de Fallot es la cardiopatía congénita cianósica más frecuente, siendo responsable de 5-8% de todas las cardiopatías y en 1 de cada 10.000 nacidos vivos. Con la evolución de las técnicas de diagnóstico como la hibridación genómica comparativa, nuevas anomalías submicroscópicas han sido reconocidas como una importante causa. Este proyecto de investigación busca identificar microdeleciones y microduplicaciones reportadas como asociadas a cardiopatías complejas tipo tetralogía de Fallot mediante la aplicación de las pruebas de amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples e hibridación genómica comparativa array, en individuos atendidos en un centro de referencia de la ciudad de Cali en el período 2011-2015. **Metodología:** se identificaron los pacientes con diagnóstico de Tetralogía de Fallot, que fueron valorados por los servicios de cardiología pediátrica y genética clínica de la Fundación Clínica Valle del Lili durante el periodo comprendido desde enero del año 2011, hasta enero del año 2015. A los pacientes reclutados se les realizaron estudios de cariotipo bandeado G con el propósito de identificar cromosomopatías asociadas a la presencia de cardiopatías

complejas. Aquellos pacientes con resultado negativo fueron posteriormente evaluados mediante las técnicas de amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples para delección 22q11, y subsiguientemente mediante estudios de Hibridación Genómica Comparativa Array, para la identificación de microdelecciones/duplicaciones que estén asociadas a la presencia de la patología a estudio. **Resultados:** Se identificaron 161 pacientes, de los cuales 35 participaron en el estudio. El cariotipo bandeado G identificó 29 individuos con cariotipo normal, cuatro casos de trisomía del cromosoma 21; y dos casos de mosaicismo genético entre los cuales se incluye un caso de mosaico de síndrome de Down, con fórmula cromosómica 46,XX[23]/47,XX+21[2]; y un caso 46XX (46, XX, der(7)t(7;14)(q36;q21)[1]/46, XX [99]). 31 pacientes son valorados mediante amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples, de los cuales 9 presentaron hallazgos positivos para delección de la región 22q11. A 14 pacientes se les realizaron estudios de Hibridación Genómica Comparativa Array, de los cuales un caso de síndrome por delección 19p13.3, región que también compromete el gen STK11, asociado al síndrome de Peutz Jegher; tres casos de síndrome por duplicación 9q34.3; y un caso de síndrome por delección 18p-. **Conclusión:** En los pacientes estudiados la causa etiológica más importante asociada a tetralogía de Fallot fue el síndrome por delección 22q11. Se identificaron 4 casos (11.4%) de pacientes con trisomía 21; y 14 casos (40%) asociados a síndromes por microdelección o microduplicación génica, de los cuales 9 casos (25.7%) corresponden a síndrome por delección 22q11. Adicionalmente en 5 casos (14.3%) se identificaron microdelecciones o microduplicaciones en regiones

previamente asociadas con fenotipo de tetralogía de Fallot (no sindrónica).

**PALABRAS CLAVES:** Cardiopatía congénita, Defectos congénitos, Microdelección, Microduplicación, Variante de copia numérica.

## 1.2. ABSTRACT

**Introduction:** Congenital heart diseases are all structural or functional defects of the heart that are present at the time of birth. These defects are caused by the abnormal formation of the heart or large blood vessels, presenting a worldwide incidence that varies from 8 to 75 per 1000 live births; of these conditions tetralogy of Fallot is the most frequent congenital cyanotic heart defect, being responsible of 5-8% of all congenital heart diseases and in 1 of every 10,000 live births. With the evolution of diagnostic techniques such as comparative genomic hybridization, new submicroscopic abnormalities have been recognized as an important cause. This research project seeks to identify microdeletions and microduplications with complex cardiopathies such as tetralogy of Fallot by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification and Comparative genomic hybridization array in individuals treated at a reference medical center in the city of Cali between the years 2011-2015. **Methodology:** We identified patients with a diagnosis of Tetralogy of Fallot, which were assessed by the services of pediatric cardiology and clinical genetics of La Fundación Clínica Valle del Lili, during the period from January 2011 to January 2015. The recruited patients underwent G-banding karyotype studies with the purpose of identifying chromosomopathies associated with the presence of complex cardiopathies. Those patients with negative result were subsequently evaluated using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification and

Comparative genomic hybridization array for the identification of microdeletions / duplications that are associated with the pathology under study.

**Results:** 161 patients were identified, of whom 35 participated in the study. G-banding karyotype identified 29 individuals with normal karyotype, 4 cases of trisomy of chromosome 21; and two cases of genetic mosaicism, among which is a case of Down syndrome mosaic, with 46,XX[23]/47,XX+21[2] karyotype, and a 46XX (46, XX, der(7)t(7;14)(q36;q21)[1]/46, XX [99]) case. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification was performed in 31 patients, of which 9 presented positive findings for deletion of the 22q11 region. Comparative genomic hybridization array was performed in 14 patients, of which one case presented 19p13.3 deletion syndrome, region that also involves the STK11 gene, associated with the Peutz Jegher syndrome; three cases of 9q34.3 duplication syndrome; and a case of 18p- deletion syndrome. **Conclusion:** In the studied sample, the most important etiological cause associated to tetralogy of Fallot was the 22q11 deletion syndrome. We identified 4 cases (11.4%) of patients with trisomy 21; and 14 cases (40%) associated to microdeletion or microduplication syndromes, of which 9 cases (25.7%) correspond to 22q11 deletion syndrome. Additionally, in 4 cases (11.4%) microdeletions and microduplications were identified in regions previously associated with tetralogy of Fallot (non-syndromic).

**KEY WORDS:** Congenital Heart Disease, Birth Defects, Microdeletion, Microduplication, Copy Variant Number.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1. Planteamiento del problema**

Las Cardiopatías congénitas (CHD) son todos los defectos estructurales o funcionales del corazón que se encuentran presentes al momento del nacimiento (1, 2). Estos defectos se originan por la formación anormal del corazón o de los grandes vasos sanguíneos (3). Esta condición tiene una incidencia mundial que varía entre 8 a 75 recién nacidos vivos por cada 1000 (1, 2) y se evidencia en el 10% de los mortinatos, presumiéndose como causa importante de muerte fetal temprana (4).

Los defectos incluidos dentro del grupo CHD varían de severidad, desde la presencia de pequeñas comunicaciones entre cámaras cardíacas, que pueden resolver de manera espontánea; hasta la presencia de malformaciones congénitas mayores que requieren de múltiples intervenciones quirúrgicas antes de la edad escolar; y que puede resultar en la muerte en útero, durante la infancia, o niñez (3). Entre los defectos complejos más frecuentes se incluyen: tetralogía de Fallot (TOF), Transposición de grandes vasos, defectos del septum atrioventricular (AVSD), coartación de aorta, y síndrome de corazón izquierdo hipoplásico (3).

Las CHD son consideradas de alta importancia para la salud pública debido a su alta incidencia, severidad clínica, y manejo clínico complejo. En algunos casos el adecuado diagnóstico etiológico de las CHD es de gran importancia para proveer un manejo clínico adecuado (5,6). Aproximadamente la mitad de las muertes causadas por CHD ocurren durante la infancia, pero gracias a los avances en el diagnóstico prenatal, estrategias correctivas, y cuidado longitudinal; se ha logrado reducir sustancialmente la mortalidad infantil. Actualmente, cerca del 75% de los pacientes con CHD que sobreviven el primer año de vida, vivirán hasta la adultez (4, 7, 8). Algunos estimados definen la prevalencia en adultos de CHD en aproximadamente 3000 por millón, por lo cual se predice que aproximadamente hay 21 millones de adultos viviendo con CHD, y se espera un incremento de esta población en un 5% anual (9).

La etiología de las CHD en su mayor parte es desconocida y se hipotetiza que es de origen multifactorial. Solamente al 15% de los casos de CHD se les puede definir causa. Se reporta que las aneuploidias cromosómicas son responsables del 8-13% de todos los casos de CHD (5, 9, 10), incluyendo, entre otros, la trisomía 13, trisomía 18, síndrome de Down, síndrome de Turner y síndrome de DiGeorge (deleción 22q11), y las alteraciones monogénicas son causa del 3-5% (10).



En los casos de CHD no sindrómicas, el escenario es menos claro, siendo aproximadamente el 2% de los casos atribuibles a factores ambientales conocidos, siendo los demás casos considerados multifactoriales, donde factores ambientales y genéticos interactúan en su etiología (10, 11).

En las últimas décadas se han identificado varias alteraciones monogénicas, y arreglos submicroscópicos cromosómicos como causa de CHD sindrómicas y no sindrómicas (12-15). Con la evolución de técnicas como la hibridación genómica comparativa (array CGH), nuevas anormalidades submicroscópicas conocidas como variantes de copia numérica (CNV) han sido reconocidas como una importante causa de CHD (9). CNV generalmente no son detectadas en estudios citogenéticos clásicos o son detectados en estudios de Inmunofluorescencia In situ (FISH) (16); Estudios como el array CGH y la técnica de Amplificación Múltiple de Sondas Dependientes de Ligación (MLPA) son recomendados en la detección de CNV, y actualmente son consideradas pruebas necesarias en individuos con retraso del desarrollo, retardo mental, desordenes autistas, y anomalías congénitas múltiples. Sin embargo, su uso en CHD siguen siendo discutidos debido a la falta de estudios realizados (16), principalmente en países como Colombia, donde el acceso a dicha tecnología es limitada.

Debido a las bajas tasas de aptitud reproductiva en pacientes con CHD y la alta mortalidad que se evidenciaba previamente en las CHD, los primeros estudios genéticos de CHD familiar estaban sesgados hacia malformaciones no complejas como los defectos del septum atrial (ASD), y los defectos del septum ventricular (VSD). La mejora en el estado de salud y sobrevida de los pacientes con CHD, en asociación a los adelantos en la tecnología genómica, ha permitido a las metodologías contemporáneas una oportunidad sólida para análisis genómicos completos de todos los pacientes con CHD, incluyendo aquellos con malformaciones esporádicas y complejas, como la TOF (4).

La TOF es la CHD cianósante más frecuente, presentándose en 5-8% de todas las cardiopatías y en 1 de cada 10.000 nacidos vivos (17-19). Esta anomalía se caracteriza por la presencia de alteraciones anatómicas fundamentales: defecto septal ventricular, cabalgamiento de la aorta, obstrucción al tracto de salida del ventrículo derecho e hipertrofia ventricular derecha (20).

En la literatura no se reportan estudios realizados en Colombia que busquen caracterizar e identificar variantes moleculares asociadas a la aparición de CHD, particularmente en cardiopatías mayores como lo es TOF. Los estudios realizados son escasos y los pocos reportados se enfocan en análisis descriptivos o de prevalencia (20, 21). A nivel internacional se han realizado varios aportes sobre el

tema (4), pero dichos hallazgos puede que no se expresen de igual manera con una población con un genoma de características únicas como el hallado en la población colombiana, específicamente en la que habita el sur occidente colombiano, por lo que persisten incertidumbres sobre el conocimiento de la etiología molecular de esta condición en esta población.

Este proyecto de investigación busca aportar conocimiento nuevo desde las ciencias básicas, específicamente la biología molecular y la genética mediante la identificación de variantes genómicas implementando técnicas de laboratorio molecular como lo son el array CGH y MLPA, en una muestra de individuos con TOF, atendidos en un centro médico de alta complejidad y de referencia del sur occidente colombiano.

## **2.2. Pregunta de investigación**

¿Cuáles son las microdeleciones y microduplicaciones asociadas a la aparición de tetralogía de Fallot en individuos del sur occidente colombiano?

## **2.3. Justificación**

CHD es la anomalía congénita más frecuente en recién nacidos, también es una de las causas más frecuentes de mortalidad infantil y morbilidad a largo plazo (22, 23). Las anomalías cromosómicas, las variantes de copia numérica, las alteraciones monogénicas, y la exposición in útero, podrán llegar a explicar aproximadamente un 25% de los casos de CHD; entre los casos restantes existe un componente de heredabilidad importante que se encuentra sin explicación (24).

El desarrollo de nuevas técnicas moleculares y los avances en las ciencias biológicas implican un rejuvenecimiento en la investigación acerca de la morfogénesis cardiovascular (25). La identificación de genes causales en formas heredadas de CHD ha permitido distinguir hacia vías específicas de la enfermedad y en el proceso proveer de conocimiento nuevo tangible sobre el desarrollo cardíaco (2), que puede ser de utilidad en el diagnóstico y consejería genética de individuos afectados.

En la ciudad de Cali, en el periodo 2012—2013 en la Fundación Clínica Valle del Lili, institución de referencia de cirugía cardiovascular y atención de patologías de alta complejidad, se registraron 1891 nacimientos de los cuales, el 7,4% presentaron algún defecto congénito; de estos al 25.3% (58 pacientes) se les identificó algún tipo de CHD (26).

Actualmente se desconoce el aporte de las microdeleciones y microduplicaciones a las CHD, particularmente en las cardiopatías mayores como la TOF, en la población del sur-occidente colombiano. Al ser las CHD de alta importancia para la salud pública debido a su alta incidencia, esto asociado a las características únicas presentadas por la población del sur occidente colombiano debido a su marcado antecedente histórico de mestizaje racial, es relevante el desarrollo de estudios que permitan identificar específicamente las variantes genéticas asociadas a la aparición de estas patologías en esta población.

Este estudio busca aportar conocimiento sobre las CNV presentes en CHD, específicamente TOF, en la población del sur occidente colombiano, permitiendo el desarrollo de nuevas líneas de investigación en CHD, e implementando tecnologías para el diagnóstico y consejería genética de aquellos individuos afectados por estas patologías.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1. Epidemiología de las Cardiopatías Congénitas**

Las CHD son alteraciones estructurales del corazón o de los grandes vasos que presentan o tienen potencialmente el riesgo de un compromiso funcional. Las cardiopatías congénitas son consecuencia de alteraciones en el desarrollo embrionario del corazón, principalmente entre la tercera y décima semanas de la gestación (27). Estas son la principal causa de anomalías congénitas mayores, aportando el 28% de los casos, siendo así uno de los mayores problemas en salud a nivel global (28, 29).

Las CHD son condiciones serias y comunes que tienen un impacto significativo en la morbilidad, mortalidad, y en los costos a nivel del sistema de salud. En Estados Unidos (USA) se reporta una incidencia entre 4 a 10 por cada 1,000 nacidos vivos con un promedio de 8 afectados por 1,000 nacidos vivos (3). Se estima un mínimo de 40,000 infantes afectados cada año, de los cuales el 25% (2.4 por 1,000 nacidos vivos) requerirán de tratamiento invasivo durante el primer año de vida (3).

Durante el periodo comprendido entre el año 1999 al año 2006 se registraron 19.4 millones de decesos en USA, de los cuales el 0.21% (41,494 casos) estaban relacionados con CHD, y el 48.1 % de estos ocurriendo en menores de 1 año de

edad (30). En Europa la prevalencia de esta condición se ha establecido en 8 por cada 1,000 recién nacidos vivos. Se estima que en la Unión Europea anualmente 36,000 niños nacen con alguna CHD, y que otros 3,000 son diagnosticados, pero fallecen por terminación voluntaria del embarazo debido a la presencia de anomalías congénitas (29, 31).

Van der Linde y colaboradores en el 2011 realizaron una revisión sistemática y meta análisis de 114 artículos que incluyo 24'091,867 nacidos vivos. Este estudio evidencio un aumento de la prevalencia mundial de CHD pasando de 0.6 /1,000 en el año1930 a 9.1/1,000 en 1995, y establece que aproximadamente 1,35 millones de niños nacen cada año con CHD en el mundo (32).

En Latinoamérica, y específicamente en Colombia, los datos epidemiológicos sobre las CHD son menos claros. En estos territorios se cuenta con dos importantes registros de vigilancia para malformaciones congénitas: el Registro y Vigilancia Epidemiológica de Malformaciones Congénitas Externas (RYVEMCE) en México y el Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas (ECLAMC) que cubre la mayor parte de Sudamérica (33, 34). La RYVEMCE ha descrito para México una tasa de 1 caso de CHD por 1,000 recién nacidos vivos (33), y el ECLAMC de 2.3 por 1,000 recién nacidos vivos (34).

En Brasil, durante el año 2007 el 6% de los fallecimientos en menores de un año fueron causados por CHD (35). En el año 2015 Pinto Júnior y colaboradores calcularon una incidencia de 25,757 casos nuevos por año, con una ocurrencia de CHD distribuidas en las diferentes regiones de Brasil de la siguiente manera, norte: 2,758; noreste: 7,570; sureste: 70,112; sur: 3,329; medio-oeste: 1,987 (36). Estudios de Caneo y colaboradores en la ciudad de São Paulo evidenciaron 7,155 decesos en infantes en el año 2010, de los cuales el 8.48% (607 casos) la causa subyacente eran CHD (37).

En Colombia Baltaxe y colaboradores en el 2006, realizaron un estudio prospectivo de casos y controles registrando 44,985 neonatos nacidos en 11 hospitales colombianos durante el periodo entre el 1 junio del 2001 hasta el 30 de abril del 2005. De los nacimientos reportados se identificaron 55 casos con CHD, para una prevalencia calculada de 1.2 por 1,000 (38).

Para el año 2013, se notificaron 4,540 casos para el evento de anomalías congénitas a través del Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) del Instituto Nacional de Salud (INS). Para este evento las CHD fueron la anomalía congénita con mayor número de reportes contribuyendo un 17.67% (en el informe original lo sitúan como la segunda más frecuente después del evento otras malformaciones en un 25.26% de los casos) (39).



En la ciudad de Cali (Colombia), en el Hospital Universitario del Valle, el mayor centro de referencia de la red de salud pública de la ciudad, donde se remiten y atienden a la mayoría de las mujeres embarazadas con patologías que necesitan atención de alta complejidad (40). Se registraron prevalencias para CHD de 4.2 por 10,000 recién nacidos en el periodo entre 1987 y 1988, y de 14.55 para el periodo 2004 a 2008 (40, 41). Un estudio posterior realizados en dos instituciones de esta ciudad, una institución de atención en salud de mediana complejidad y una institución de atención de alta complejidad; se reportaron 7,140 nacimientos en un periodo de 20 meses comprendidos entre los años 2012 y 2013, lo que representa el 15 % de todos los nacimientos de la ciudad (26). En el 3.1% (225 casos), se presentó algún defecto congénito, de los cuales el 20% (66 casos) presentaban CHD (26).

### **3.2. Conceptos contemporáneos en la Cardiogénesis**

Para entender cómo afectan las alteraciones genéticas la regulación molecular de procesos fisiopatológicos asociados a la aparición de CHD, particularmente en la TOF, es importante comprender como se lleva a cabo el proceso del desarrollo embriológico cardiovascular, haciendo énfasis en el rol de los mecanismos reguladores moleculares que intervienen en el desarrollo de la bomba cardiaca y sus grandes vasos.

La formación del corazón requiere de la ejecución de una serie eventos moleculares y morfogenéticos precisamente organizados; en donde incluso la más sutil alteración de estos puede generar consecuencias severas en la forma de CHD. El curso de la formación cardíaca en el embrión ha sido conocido por varias décadas, sin embargo, era poco lo que se conocía sobre los genes que controlan su desarrollo, hasta recientemente. La información obtenida de estudios en modelos de organismos vertebrados e invertebrados han permitido identificar genes asociados al control del desarrollo cardíaco, los cuales actualmente pueden ser investigados como posibles responsables de CHD (42, 43).

La cardiogénesis es uno de los pasos más tempranos e importantes del desarrollo humano y se encuentra coordinado por familias celulares de progenitores cardíacos, que constituyen diferentes regiones del corazón fetal (44). El sistema cardiovascular inicia su desarrollo durante la tercera semana de edad gestacional, momento del desarrollo en donde los requerimientos nutricionales del embrión no son satisfechos exclusivamente por los procesos de difusión celular (45).

La serie de eventos que ocurren durante la cardiogénesis son: I. Especificación de células derivadas del mesodermo y de la cresta neural para programarse en el linaje cardíaco, II. El crecimiento y diferenciación de estas células en cardiomiocitos, y III. Su migración y modelamiento morfogenético en el corazón maduro (46).

Las células progenitoras cardíacas son inducidas a partir de células del mesodermo esplácnico que conforman el segmento anterior de la línea primitiva, también conocida como mesodermo de placa lateral. Los cardiomiocitos surgen como respuesta a factores estimulantes que se producen en poblaciones celulares adyacentes como del endodermo visceral anterior, el endodermo definitivo, ectodermo, y precursores de la notocorda (47). Las señales de las células del endodermo anterior estimulan la especificación cardíaca, mientras que señales de la placa neural, y del mesodermo somático y axial inhiben la formación cardíaca (Ver figura 1.) (48, 49).

Los factores estimulantes de la cardiogénesis incluyen ligandos de Wnt y de *Sonic hedgehog* (SHH), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), miembros de la superfamilia factor de crecimiento transformante (TGF) nodal, y proteínas morfogenéticas óseas (BMP). La regulación inhibitoria se obtiene principalmente a través de la vía de señalización Wnt, que es inhibida por su antagonista dickkopf1 (Dkk1) y *crescent* (Ver figura 1.) (49).

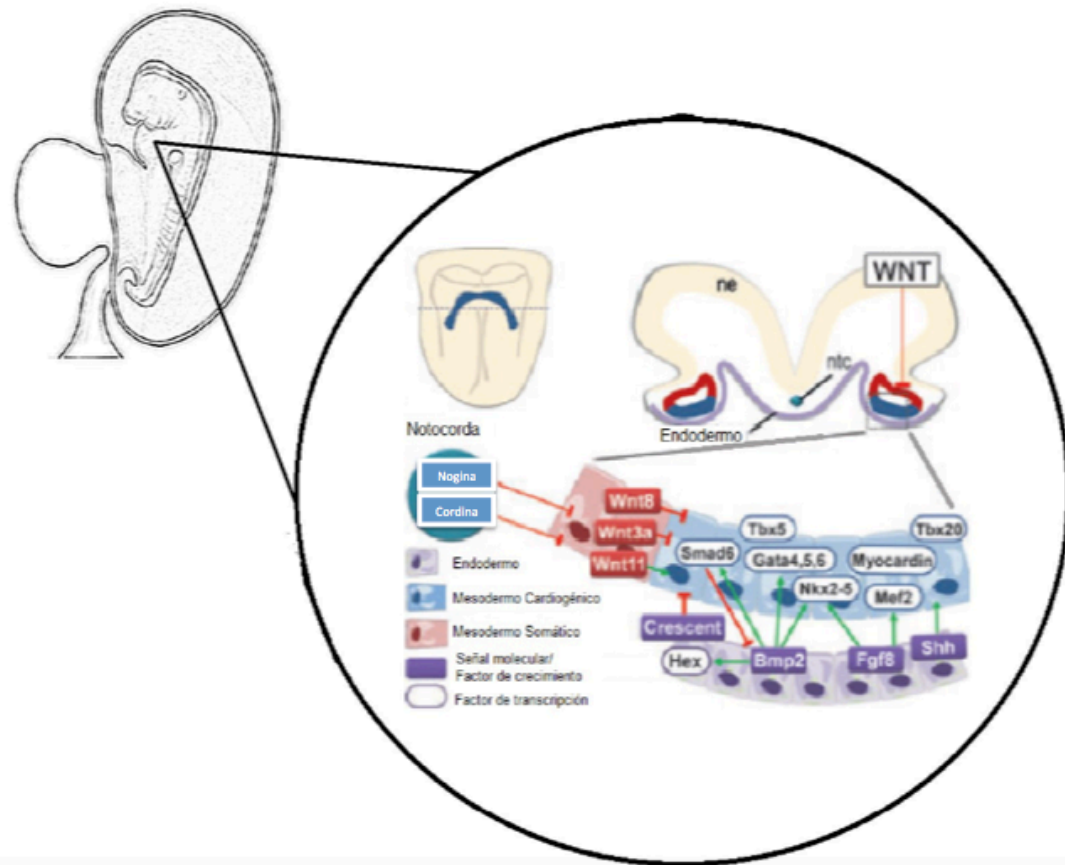
En los vertebrados, el programa transcripcional que guía la especificación del mesodermo esplácnico en mesodermo cardiogénico requiere de la participación de del factor de transcripción T-box Eomesodermina (50). Durante la etapa de aparición de la línea primitiva en el embrión, Eomesodermina activa el factor de transcripción básico hélice-bucle-hélice mesodermo posterior 1 (Mesp 1)( 51) el

cuál induce la especificación del mesodermo cardiogénico mediante la regulación decreciente de genes pluripotenciales y el aumento de expresión de factores de transcripción cardiogénico como el factor dedos de zinc Gata 4, el factor de transcripción homeobox clase NK (*Nkx2.5*), factor potenciador específico de miocitos (*Mef2*), Smarcd3, y un cofactor transcripcional en el complejo remodelador de cromatina SWI/SNF (49,52,53).

*Nkx2.5* coopera con factores de transcripción tipo dedos de zinc de la familia GATA para activar la expresión de genes cardíacos, estas dos clases de factores de transcripción cardíacos también se regulan el uno al otro a través del refuerzo mutuo de circuitos de retroalimentación positiva. En estudios realizados en moscas se encontró que la expresión del gen homeobox *tinman*, quien presenta función homóloga a *Nkx2.5*, es necesario para la especificación del linaje cardíaco y activa directamente la transcripción de genes de la familia del factor potenciador específico de miocitos (*Mef2*), quien codifica factores de transcripción que controlan la diferenciación de miocitos (43).

*Nkx2.5* y *Mef2c*, integrante de la familia *Mef2*, se expresan temprano durante la cardiogénesis, son capaces de homodimerizar, unir ADN, y regular genes cardio-específicos comunes como factor natriurético atrial (*ANF*). Adicionalmente, ambos factores interactúan y cooperan en la regular la transcripción de otros factores de transcripción. *Hand2* y *Gata4*. *Nkx2.5* y *Mef2c* han demostrado participar en un

ciclo de control positivo transcripcional que inicia la cardiomiogénesis, por lo que se hipotetiza que ellos cooperan regulando diferentes aspectos del programa cardíaco (Ver figura 1.) (54).



**Figura 1. Inducción molecular de células progenitoras.** Se observa inducción de células del mesodermo esplácnico por parte de reguladores moleculares de los tejidos adyacentes. Señalización de Wnt por parte del neuroectodermo (ne) inhibe la formación de mesodermo cardiogénico, Nogina y Cordin de la notocorda (ntc) inhiben la señal Wnt permitiendo la diferenciación a mesodermo cardiogénico. Señales endodérmicas de BMP, FGF, SHH permiten el inicio de la diferenciación cardíaca mediante la activación de genes que codifican factores de transcripción como Nkx2-5, Gata4/5/6, Tbx5, y Mef2c. – Gráfico original de Rana y col. (2013) modificado por autor (49).

### 3.3. Campos cardiogénicos

Una vez se induce la formación de las células progenitoras cardiogénicas, estas migran en sentido craneolateral para formar dos campos bilaterales para la formación del corazón (49, 55 ,56). Un primer conglomerado celular se agrupa en forma de herradura o luna creciente craneal a las crestas neurales (cresta cardiaca), estableciendo el campo cardiogénico primario (PHF). Este grupo dará origen a la estructura del ventrículo izquierdo (57).

Para que se produzca la formación de los campos cardiogénicos, las células progenitoras cardiacas van a depender de la expresión del gen *Mesp1*. Las primeras células en expresar *Mesp 1* conformarán el PHF, responsable de formar la herradura cardiaca. Una posterior segunda onda de expresión de *Mesp 1* produce a los progenitores cardíacos del campo cardiogénico secundario (SHF) a partir de células que residen en el mesodermo esplácnico ventral a la faringe. Esta segunda población celular se localizará anterior y medial a las células del PHF y es la responsable del desarrollo de los atrios, ventrículo derecho y el tracto de salida (conus cordis y tronco arterioso) (57).

A medida que las células del PHF se diferencian y proliferan durante el proceso de desarrollo del tubo cardiaco linear, las células del SHF permanecen en un estado indiferenciado de progenitor miocárdico y se posicionan dorsalmente al tubo cardiaco (57,58). Estudios de linaje realizados en embriones de ratones y pollos

han demostrado que las células de PHF contribuyen principalmente al desarrollo del ventrículo izquierdo, con pequeñas contribuciones al atrio, mientras que el SHF células progenitoras de su segmento anterior originan el ventrículo derecho y tracto de salida, mientras que células de su segmento posterior actúan como precursores del atrio y del tracto de entrada (59-65). Los progenitores del SHF exhiben un aumento de la proliferación y retardo en el proceso de diferenciación celular en comparación a los progenitores del PHF, diferenciándose a medida que contribuyen a la formación de los polos venoso y arterial del tubo cardiaco linear, promoviendo su elongación (Ver figura 2.) (56, 66).

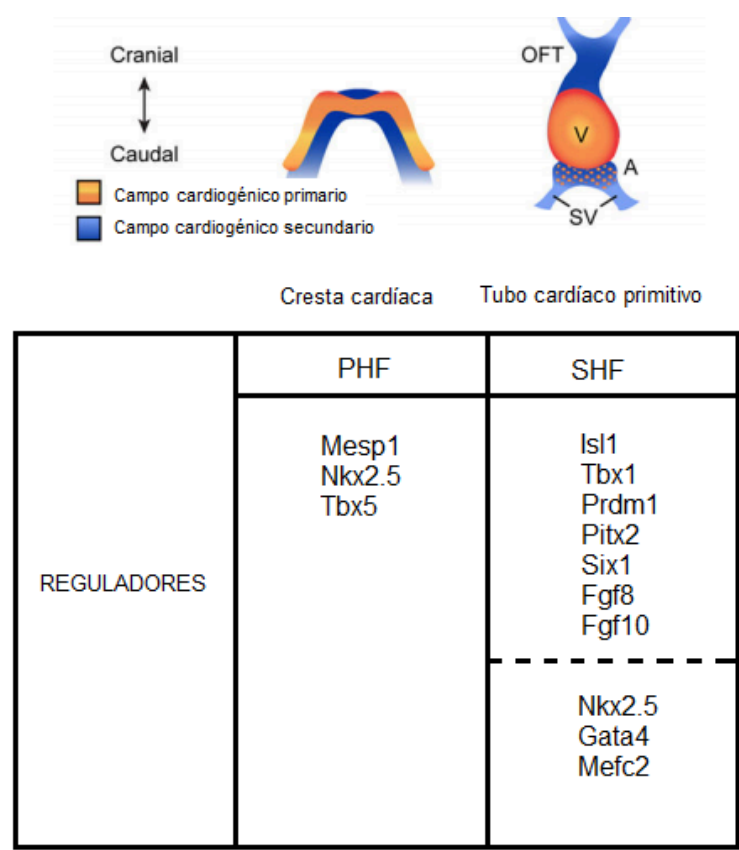
Las células del PHF se pueden identificar por la expresión de una primera ola de *Nkx2.5*, y por *Tbx5* (67, 68). Igualmente se ha identificado la expresión del gen para canal de iones *HCN4*, el cual se reporta es específico para el PHF, y permitió identificar al nodo atrioventricular y partes del sistema conductor primitivo cardiaco, como derivados del PHF (69,70). El SHF se caracteriza por la expresión del factor de transcripción *Islet 1*(*Isl1*) (63, 67, 71), y *Tbx1* el cuál se ha demostrado coordina la contribución de SHF a los dos polos del tubo cardiaco linear (73). Otros genes expresados por SHF incluyen *Prdm1*, *Pitx2*, *Six1*, *Fgf8*, y *Fgf10* (58, 63-66,73, 74). A medida que progresa el proceso de diferenciación cardiaca, durante la adición de células del SHF al tubo cardiaco, estos genes disminuirán su expresión a medida que se activa una segunda línea de factores de transcripción, donde se incluyen los genes *Nkx2.5*, *Gata4* y *Mef2c*, previamente descritos (Ver Figura 2 y 3) (59, 64).

La diferenciación tardía y proliferación continua de los progenitores de SHF son regulados por *FGF*, *SHH*, y vías de señalización *Wnt/  $\beta$ -catenina*. *Fgf8* ha sido identificado como la molécula necesaria para inducir la cardiomiogénesis en el SHF. Otros miembros de la familia *FGF* como *Fgf3* y *Fgf10* también han sido asociados en el desarrollo de SHF (75). *SHH* se expresa en el endodermo faríngeo adyacente, y es necesario para la proliferación de SHF (76), mediante la activación un set de factores de transcripción tipo cabeza de horquilla, que incluye a los factores *Foxa2*, *Foxc1*, y *Foxc2*; quienes a su vez activan *Tbx1* (77, 78). *Tbx1* es crítico para regular la proliferación mediante la activación de *Fgf3*, *Fgf8*, y *Fgf10*, e impactando negativamente la diferenciación mediante la inhibición de *Mef2c* y Factor de respuesta al suero (SRF) (49, 79-85). Las vías de señalización *Wnt/  $\beta$ -catenina* activan la proliferación de SHF en embriones de ratón y promueven la multipotencialidad de los progenitores *Isl1* derivados de células madre embrionarias (Ver figura 4) (57, 86, 87).

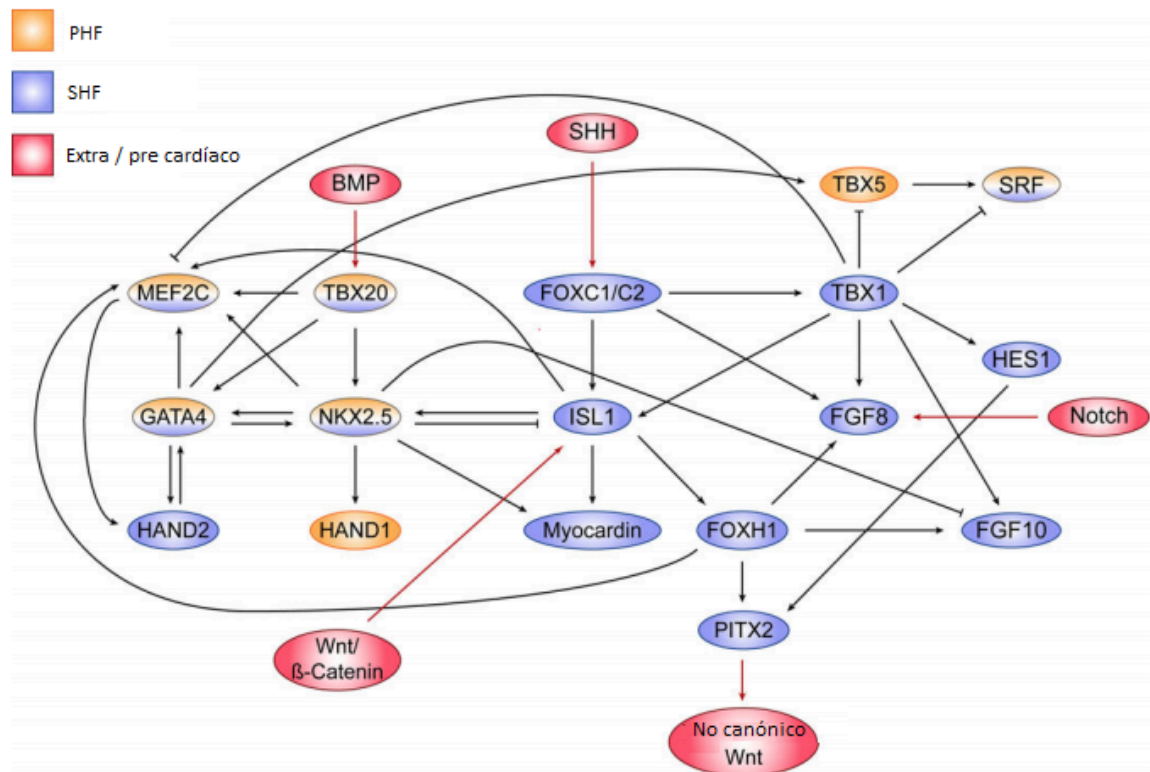
*Isl1* es el marcador por excelencia del SHF, su presencia ha sido identificada en la cresta cardiaca, y en la ausencia de *Nkx2.5*, su expresión permite la diferenciación de células miocárdicas en este estadio temprano del desarrollo cardiaco, hasta estadios más avanzados, lo que sugiere que dicha regulación actúa en ambos campos cardiogénicos (53,88). *Isl1* ha sido previamente reportado en PHF, sin embargo, en estudios como el realizado por Cai y



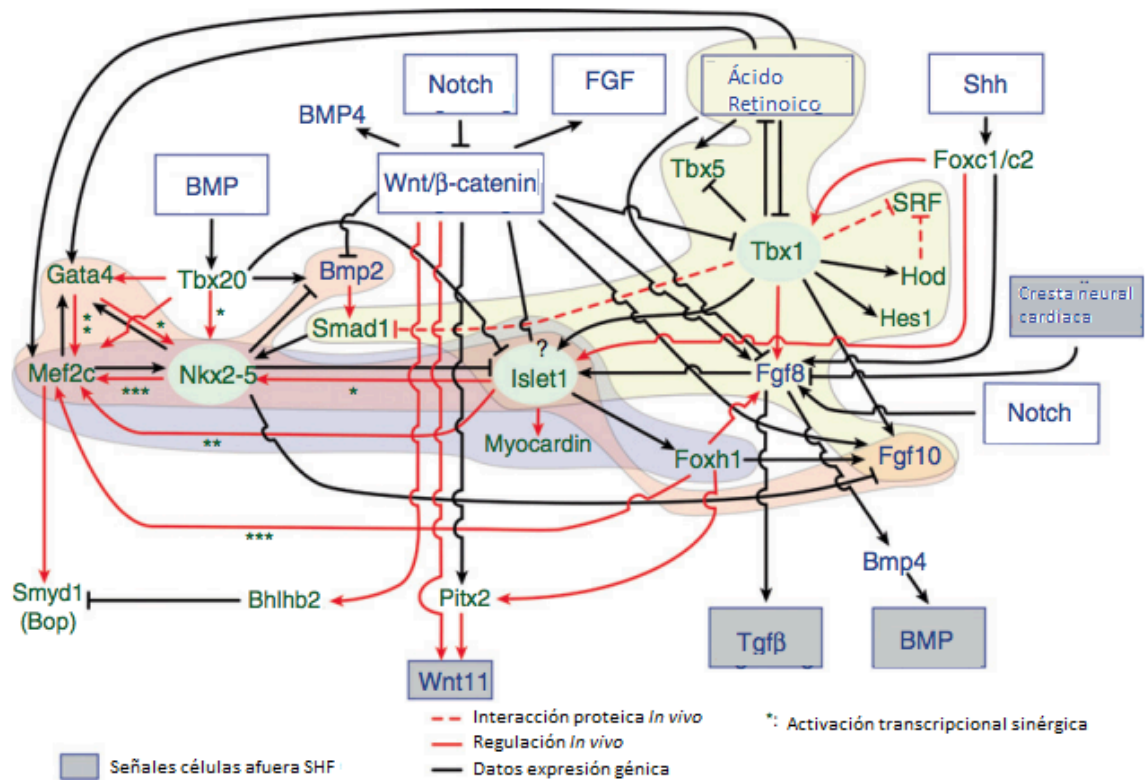
colaboradores en el 2013, demuestran que en modelos knock-out, el fenotipo expresado refleja principalmente problemas a nivel de los derivados del SHF (49, 53, 63).



**Figura 2. Reguladores moleculares y distribución de los campos cardiogénicos en el tubo cardiogénico primitivo.** Obsérvese las estructuras clásicas derivadas de los campos cardiogénicos primario y secundario, al igual que el listado de la Primera y segunda línea de factores de transcripción. SV: seno venoso, A: atrio, V: ventrículo primitivo, OFT: tracto de salida. – gráfico original de Paige y col. (2015) modificado por autor (57).



**Figura 3. Vía de regulación molecular de los campos cardiogénicos.** PHF: Campo cardiogénico primario, SHF: campo cardiogénico secundario. – Gráfico original de Paige y col. (2015) modificado por autor (57).



**Figura 4. Vía de regulación molecular del campo cardiogénico secundario.** - Gráfico original de: Vincent SD, Buckingham ME. How to make a heart: the origin and regulation of cardiac progenitor cells. *Curr Top Dev Biol.* 2010;90:1-41. doi: 10.1016/S0070-2153(10)90001-X.

### **3.4. Cresta neural y contribución proepicárdica**

Células de otros linajes embrionarios también contribuyen significativamente al desarrollo de corazón en conjunto a PHF y el SHF. La cresta neural post-ótica se describe como la generadora de una población celular denominada como la cresta neural cardiaca, población que migra del tubo neural en sentido dorsolateral hasta alcanzar los arcos faríngeos caudales, y posteriormente migra hacia el tracto de salida cardiaco (89). Estas células son las responsables de establecer el septum aórtico pulmonar, que divide el tracto de salida en las arterias aortica y pulmonar; y dan origen a células del musculo liso en la túnica media de ambos vasos en la región distal del polo arterial (61, 90).

Estudios realizados durante la última década han revelado información importante sobre los aportes de las células de la cresta neural a la cardiogénesis. Estudios como los realizados por Arima y colaboradores han demostrado que células de la cresta neural pre-ótica contribuyen al desarrollo de la región conotruncal y el septum interventricular (91); adicionalmente, Escot y colaboradores identificaron el factor derivado de células estromales-1 (SDF1) como un agente quimiotáctico que impulsa a las células de la cresta neural a migrar en sentido hacia los arcos faríngeos (92). Holler y colaboradores observaron una reducción marcada en las células derivadas de la cresta neural del tracto de salida posterior a la perdida de expresión de *Hand2* en modelos murinos (57,93).

Farrell y colaboradores evidenciaron en modelos animales, donde se suprimieron las células de la cresta neural cardiaca, la presencia de diferentes alteraciones cardiacas que incluían tronco arterioso persistente, defectos en la alineación del polo arterial, y remanentes aberrantes de canales de calcio miocárdico originados por elevación de *Fgf8* (94). El despliegue coordinado de las células de la cresta neural cardiaca y su relación con las células del SHF se encuentra resaltado por los requerimientos de señales *Jagged-1/Notch* del SHF para regular la expresión de *Fgf8*, molécula esencial para la migración de las células de la cresta neural cardiaca y transición endotelio-mesenquimatosa. (95, 96). Adicionalmente la cresta neural cardiaca contribuye a la innervación autonómica y sensitiva del corazón (94).

Sobre los reguladores moleculares que determinan el desplazamiento de las células del órgano proepicardico para cubrir la superficie del corazón en desarrollo, es poco lo descrito en la literatura, sin embargo, estudios en embriones de ratón sugieren que interacciones entre integrinas  $\alpha 4$  y moléculas de adhesión vascular 1 (VCAM) son importantes para mantener el recubrimiento epicardico en el embrión posterior al día 11 de gestación (97, 98). Algunas de estas células pasan por un proceso de transición epitelio mesenquimatosa e invaden el miocardio subyacente. Algunos estudios han demostrado que acción de Notch 1 juegan un rol critico en este proceso al promover la migración de progenitores

vasculares a través del miocardio compacto (99). Estas células entonces se diferencian en fibroblastos cardiogénicos y células del músculo liso de las coronarias (100, 101). Subpoblaciones específicas del proepicardio podrían también contribuir al endotelio coronario (57, 102).

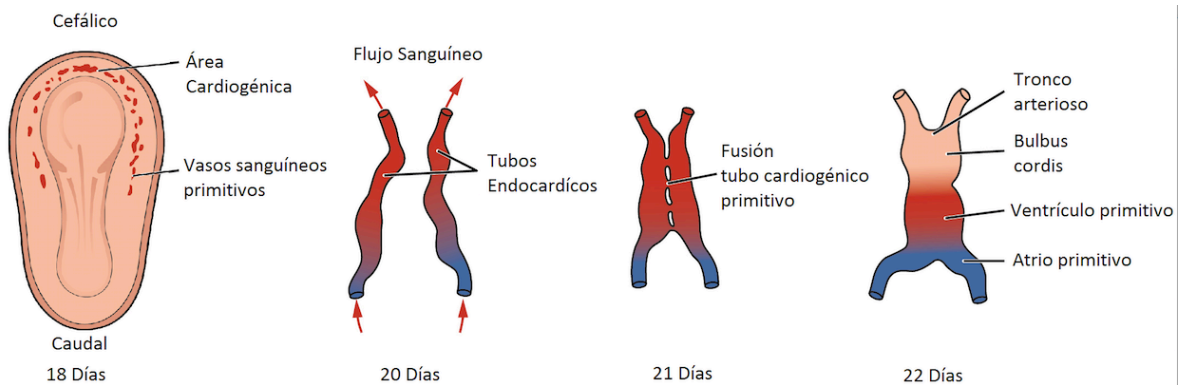
### **3.5. Tubo cardiogénico primitivo**

Entre los días 19 a 21 del desarrollo embrionario debido a la diferenciación del mesodermo esplácnico craneal, las propiedades contráctiles del endodermo subyacente, y los plegamientos del disco embrionario se produce un cambio estructural a nivel de la cresta cardíaca, dando como resultado la aparición de un corazón tubular (103,104). El corazón embrionario en este estadio está compuesto de una capa interna de endocardio, rodeado de una capa intermedia acelular de gelatina cardíaca, y una capa externa de miocardio (103); es bilateralmente simétrico, con su segmento caudal unido a las tributarias venosas, saco vitelino, y placenta (49).

El corazón en su segmento posterior se separa de la pared ventral de la faringe a medida que los precursores cardíacos se fusionan para formar el tubo cardíaco primitivo, sin embargo, este persiste temporalmente adherido a la pared de la cavidad celómica por medio del mesocardio dorsal. Con el desarrollo continuo de

los márgenes laterales del tubo cardiaco, su desplazamiento a la línea media y su desprendimiento de la pared celomica dorsal, se concluye la formación y cierre del tubo cardiogénico con la presencia del seno transverso pericárdico que conecta ambos extremos de la cavidad pericárdica, y permite que el corazón quede suspendido en la cavidad torácica por medio de los vasos sanguíneos en su segmento craneal y caudal (Ver figura 5) (45,49). Durante este proceso la mayor parte del mesodermo cardiogénico permanece indiferenciado, particularmente la población celular localizada en la porción medial y posterior a la cresta cardiaca (correspondiente al SHF) (65). Sin embargo, a medida que progresa el desarrollo del tubo cardiogénico primitivo, estas células mantienen una alta tasa de proliferación y son añadidas gradualmente al corazón alargando el tubo cardiogénico (precursores polo arterial y venoso del SHF) (49). Subsecuente a la perdida de conexión con el mesocardio dorsal, las células progenitoras pueden ser añadidas al corazón únicamente a través de sus polos venosos o arteriales (49).

La elongación del corazón tubular ha sido atribuida principalmente a la población celular del SHF, algunas de las primeras descripciones que ayudaron a establecer dicha asociación datan desde los modelos animales de Viragh y Challice en 1973, Arguello y colaboradores en 1975, y de la Cruz y colaboradores en 1977 (105-107), quienes demostraron la contribución dinámica de las células al corazón, particularmente en el momento posterior a la aparición de la cresta cardiaca y el tubo cardiogénico primitivo (49).



**Figura 5. Formación Tubo cardiogénico primitivo** - Gráfico original de: OpenStax College, Anatomy & Physiology, Connexions Web site. <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>, Jun 19, 2013. Tomado de: [https://en.wikipedia.org/wiki/File:2037\\_Embryonic\\_Development\\_of\\_Heart.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/File:2037_Embryonic_Development_of_Heart.jpg), Recuperado: Mar 28, 2018. - Modificado por autor.

Estudios más recientes han aplicado diferentes técnicas en modelos animales, para determinar el origen celular y los reguladores moleculares responsables del elongamiento del tubo cardiaco. Algunos de los estudios que se resaltan incluyen a Meilhac y colaboradores, en el 2003, mediante el análisis clonal retrospectivo en corazones en desarrollo de ratones, utilizando el rastreo de células marcadas, demostraron su origen a partir del ventrículo izquierdo, ventrículo derecho, tracto de salida, y atrio. Apuntando hacia un proceso de crecimiento en el cual el inicio de la diferenciación se correlaciona con la adición de células a el corazón (108).

Kelly y colaboradores en el 2001 utilizaron una línea de ratones transgénicos (transgen Mlc1v-nlacZ-24) en donde la actividad de la B-galactosidasa es observada en el ventrículo derecho, tracto de salida del corazón embrionario,



mesodermo faríngeo y esplácnico contiguo. Ellos evidenciaron movimiento progresivo de las células de la región del arco faríngeo al tubo en elongación, sugiriendo que el miocardio del polo arterial se origina por fuera del PHF (109). Adicionalmente, Cui y colaboradores en el 2009 demostraron que los precursores cardíacos se localizan contiguo y medial a la cresta cardíaca, proveyendo células a ambos polos cardíacos (110).

Estos hallazgos han conducido al actual paradigma, consintiendo el concepto de que el PHF representa los precursores cardíacos de la cresta miocárdica primitiva, siendo de importancia para el desarrollo del ventrículo primitivo del corazón tubular, mientras que el resto de las estructuras cardíacas requieren durante el elongamiento el reclutamiento de células del SHF que dan origen al tracto de salida, ventrículo derecho, septum ventricular, y segmento restante del ventrículo izquierdo y atrio (48, 49, 65, 111).

Finalmente, el tubo cardíaco primitivo es una estructura transitoria compuesta de un tubo endotelial interno, envuelto en una capa de miocardio. Esta estructura exhibe varias cavidades y constricciones destinadas a la formación de las futuras cavidades cardíacas (53, 112). Durante el periodo previo al fin de la formación del segmento caudal del tubo cardíaco, el corazón en proceso de elongación comienza a adoptar una forma en espiral derecha mediante el proceso de bucle o “looping” cardíaco. Durante este proceso los futuros ventrículos se diferencian y arquean hacia afuera, mientras que la región atrial y las tributarias venosas, son

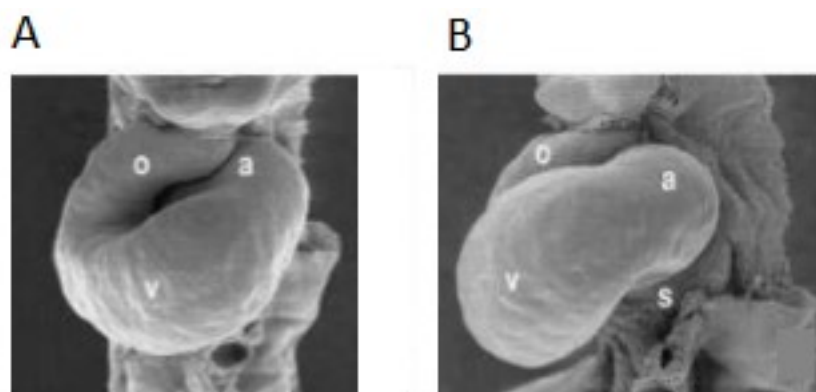
desplazadas dorsal y cranealmente; esto produce que las cavidades se alineen para su posterior integración en el desarrollo de la bomba cardiaca (53).

### **3.6. Bucle cardiaco**

Simultáneo a la rápida elongación del tubo cardiogénico y el desvanecimiento del mesocardio dorsal, se produce un cambio en la configuración de la estructura cardiaca, pasando de una bomba tubular recta a un bucle helicoidal (113-117). La secuencia de eventos morfogénéticos que llevan a esta transformación se le conocen como plegamiento cardiaco (118, 119), dicho plegamiento determina la topografía básica de la bomba cardiaca, incluyendo la asimetría derecha-izquierda de los futuros ventrículos, y adicionalmente permite desplazar a los segmentos cardíacos y los grandes vasos en desarrollo a un punto aproximado de sus relaciones topográficas definitivas (120). Una vez inicia la diferenciación de las células progenitoras cardiacas al linaje miocárdico la proliferación cesa (121), opuesto a la rápida división de los precursores del SHF (122). La adición de diferentes progenitores cardíacos en paralelo al crecimiento asimétrico del tubo cardiaco establece el movimiento diestro del corazón (Ver figura 6.) (49).

El mecanismo subyacente para la formación de este bucle derecho, persiste desconocido, sin embargo, se considera que dicho mecanismo se encuentra íntimamente relacionado al desarrollo de la lateralidad en el embrión. La lateralidad se establece durante el proceso de la gastrulación y depende del

nódulo de Hensen (123). El nódulo de Hensen, es una estructura conformada por monocilias compuestas por nueve pares de microtúbulos dobles y un par de microtúbulos centrales, los cuales se conectan por motores de dineína a sus microtúbulos adyacentes para generar movimientos rotacionales de la monocilia nodal (124). La dirección de estos movimientos es esencial para determinar el par central de microtúbulos, que como resultado establece un flujo asimétrico izquierdo de factores de crecimiento y moléculas señaladoras en el fluido extracelular. Estos eventos activan un patrón de expresión genética asimétrica que determina el eje derecha- izquierda del embrión y sus órganos (49, 120, 124).



**Figura 6. Bucle cardíaco.** A. Vista frontal modelo bucle cardíaco de embrión de pollo. B. Vista ventrolateral izquierda modelo bucle cardíaco de embrión de pollo. a: atrio, v: ventrículo, o: tracto de salida, s: seno venoso. – Gráfico original de Männer (2004). Modificado por autor (116).

Esta cascada de expresión genética inicia con la activación de nodal en el mesodermo de placa lateral izquierda (125, 126), que a su vez activa lefty-2 (127, 128) lo que conduce a la activación del factor de transcripción homeobox Pitx2 dentro de la placa del mesodermo lateral (129). La cascada nodal/lefty/Pitx2 es altamente conservada en la evolución (130,131). El factor Pitx2 es el único

componente temprano de la cascada de lateralidad que se continúa expresando en la cresta cardiaca y en el tubo cardiogénico primitivo (129, 132). Cuando las primeras células precursoras cardiacas se localizan simétricamente en el embrión en desarrollo, ya existe una expresión distintiva asimétrica de Pitx2. Posteriormente, cuando las células precursoras cardiacas migran ventralmente hacia la línea media, para formar el tubo cardiogénico primitivo, la expresión de Pitx2 permanece confinada en el segmento izquierdo del corazón tubular, aportando una contribución directa de la cresta cardiaca izquierda a el lado izquierdo del tubo cardiogénico, tal como fue demostrado en los estudios realizados por Campione y colaboradores en el 2001 (133, 134).

Nonaka y colaboradores en el 2002 publicaron sus estudios realizados en embriones de ratones, que bajo condiciones controladas se exponían a un flujo artificial derecho de nodal. Estos ratones presentaban un bucle cardiaco invertido (sentido izquierdo) y expresión derecha de Pitx2. Estos hallazgos sugieren que un flujo anormal de nodal puede alterar la programación génica izquierda-derecha, afectando la dirección de giro del bucle cardiaco (135).

El proceso del giro cardiaco establece las bases para las etapas subsiguientes de la morfogénesis cardiaca, las cuales encierran los ajustes finales en las relaciones posicionales de los segmentos cardíacos embriológicos. Estos procesos incluyen el remodelamiento de la curvatura interna ventricular para establecer la conexión

atrioventricular, remodelamiento del tracto de salida, y el acúñamiento de la válvula aortica entre la válvula mitral y tricúspide (120).

### **3.7. Especificación del miocardio cardíaco**

Los cardiomiocitos conforman el revestimiento del tubo cardiogénico, a estos se les denomina “miocardio primario” debido a su baja tasa de proliferación, limitada automaticidad, baja velocidad de conducción y pobre contractilidad (49,136). Aquellos cardiomiocitos que conforman el tracto de salida, curvatura interna, canal atrioventricular, y astas del seno venoso mantienen este fenotipo primario. A medida que las células atriales y ventriculares proliferan y se diferencian selectivamente se produce la expansión de la curvatura externa del tubo cardiaco. Este proceso ocurre a causa de los movimientos de bombeo peristáltico del tubo cardiogénico, las células miocárdicas y endocárdica alteran su tamaño y forma, proliferando en respuesta al estrés mecánico del flujo sanguíneo y contracción (57, 137-139). A diferencia de los cardiomiocitos del revestimiento cardiaco, que presentan una configuración de miocardio primario, las células atriales y ventriculares obtienen una identidad de miocardio de cámara o de trabajo, la cual se asocia con una velocidad rápida de conducción, aumento de automaticidad, aumento de la contractilidad y mejor organización de los sarcomeros (140).

Existen múltiples factores de transcripción que han sido asociados a la regulación de la morfogénesis de las cámaras cardíacas, incluyendo factores de transcripción como T-box Tbx2, Tbx3, Tbx5, Tbx20, Nkx2-5, Gata4, Cited1, Irx4, Irx1/Irx3/Irx5 y Hand1 (57). Tbx5 y Tbx20 actúan en combinación con Nkx2.5 y Gata4 para promover la especificación del miocardio de cámara, lo que incluye inducción del factor natriurético atrial, proteínas de unión gap tipo conexina 40 y conexina 43, así como la proteína citoesquelética chisel (25, 140,141). Adicionalmente, Tbx5 coopera con Nkx2.5 para regular la expresión de Id2, represor transcripcional que contribuye al modelado de las ramas del haz ventricular derecho e izquierdo (142, 143). En contraste Tbx2 y Tbx3 pueden también interactuar con Nkx2.5 y Gata4 para reprimir la especificación de cámara (Ver figura 7.) (144, 145); en el caso particular de Tbx3, este efecto permite la expresión del canal de marcapasos HCN4 en las células de la unión sinoatrial y desarrollo del nodo sinoatrial (57, 143,146).

El miocardio de cámara se encuentra altamente regulado, particularmente por los factores de transcripción T-box, aunque Nkx2.5 y Gata4 se expresan sustancialmente a lo largo del tubo cardíaco. Los factores T-box tienen patrones de expresión más restringidos (49, 141), esto se debe al patrón de concentración de ácido retinoico. Tbx5 es expresado mediante un gradiente de concentración en donde caudalmente, área del tracto de entrada y atrio primitivo, se expresan las concentraciones más altas de ácido retinoico; en el ventrículo primitivo niveles

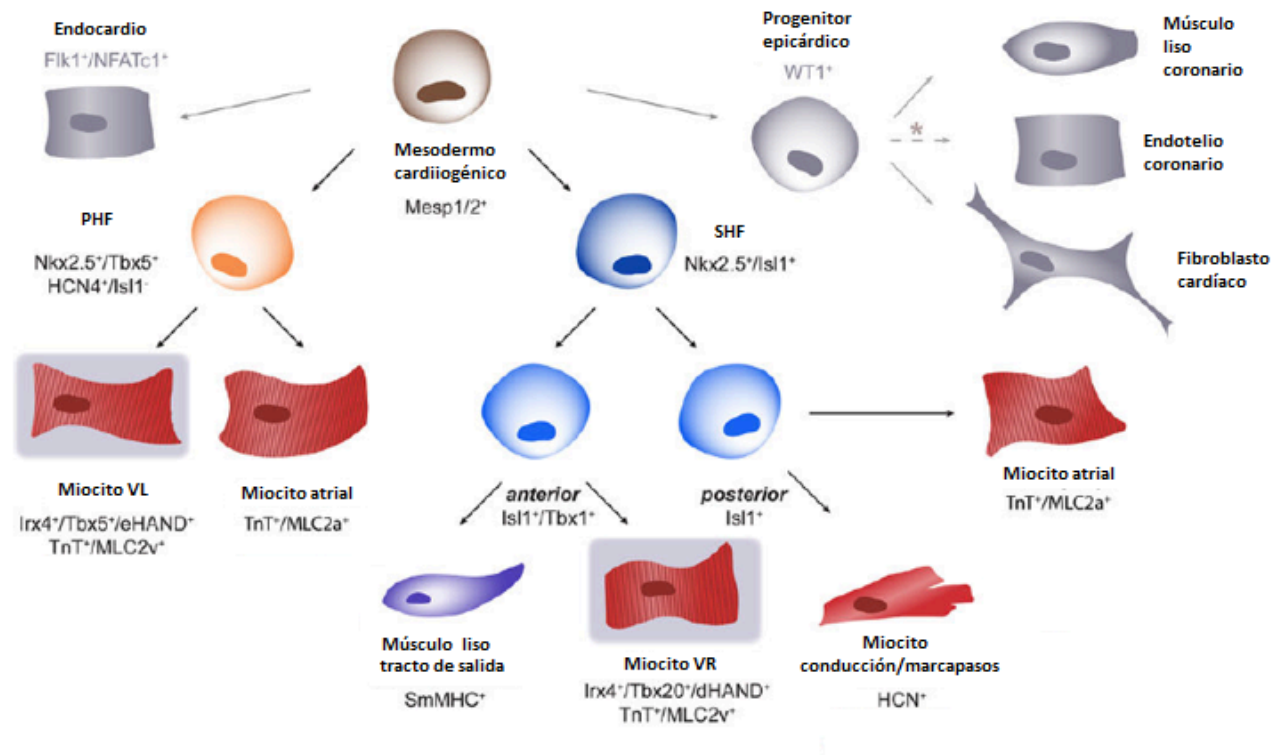
bajos de concentración; y ausencia de expresión en el tracto de salida (Ver figura 8.) (2, 57,147).

Tbx2 y Tbx3 se expresan en el miocardio del tracto de salida, curvatura interna, canal Atrioventricular y tracto de entrada. La expresión de Tbx2 se extiende más en sentido rostral, inhibiendo la proliferación y suprimiendo la expresión de genes específicos para la diferenciación a miocardio de cámara, como lo son Cx40, Cx43, Smpx y Nppa (144, 148). Tbx20 también se ha evidenciado a lo largo del tubo cardiaco, y alteraciones en este gen se asocian con defectos en el desarrollo de las cámaras cardiacas (Ver figura 8.) (57).

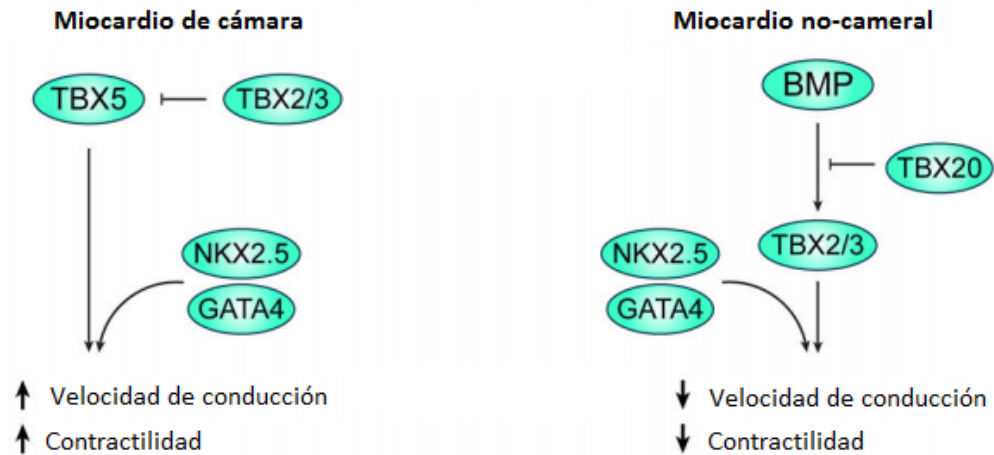
Dentro del miocardio de cámara se presentan patrones de expresión genéticos específicos para cada una de las cámaras cardiacas. En estudios realizados en ratones se identificó que atrios y ventrículos expresan isoformas de cadena liviana de miosina MLC2a y MLC2v respectivamente (149). Ambos ventrículos adicionalmente expresan Irx4, cuya función es la de activar la cadena pesada de miosina 1 (MHC1) y suprimir la expresión de MHC1 atrial (150). En diferentes modelos animales, la expresión de Tbx5 es ausente en el ventrículo derecho (151), sin embargo, se distingue expresión de Tbx20, lo cual no se observa en el ventrículo izquierdo (67).

Los factores de transcripción hélice-bucle-hélice eHAND y dHAND se expresan en los ventrículos (152), y durante el desarrollo atrial. Altos niveles de Pitx2 son detectados en el atrio izquierdo, suprimiendo la expresión de Shox 2, inhibiendo genes asociados al desarrollo del nodo sinoatrial, previniendo la aparición de marcapasos ectópicos (153,57).





**Figura 7. Vía de diversificación células cardiovasculares.** Obsérvese en color las vías de diferenciación y transcritores moleculares de los miocitos cardíacos. VL: Ventrículo izquierdo, VR: Ventrículo derecho. Gráfico original de Paige y col. (2015), modificado por autor (57).



**Figura 8. Diferenciación miocardio de cámara.** - Gráfico original de Paige y col. (2015), modificado por autor (57).

### **3.8. Desarrollo de las cámaras cardíacas.**

El desarrollo de las cámaras cardíacas en el tubo cardíaco primitivo, ocurre como resultado de la diferenciación de las células miocárdicas. Inicialmente el tubo cardiogénico está compuesto de miocardio de lenta proliferación (135, 153, 154), separado por el canal atrioventricular, el cuál retiene sus propiedades primarias miocárdicas. En estadios tempranos del desarrollo del tubo cardíaco, la sangre es drenada del polo venoso hacia el atrio común y viaja a través del canal atrioventricular y ventrículo hasta llegar finalmente al tracto de salida (25, 155).

Durante el proceso de maduración y plegamiento de la bomba cardíaca, las células miocárdicas tanto de la futura cámara ventricular, como la atrial adquieren diferentes características que incluyen: rápida conducción, adecuado desarrollo de las estructuras sarcoméricas, alta contractilidad y automaticidad (139), permitiendo a los cardiomiocitos adquirir un fenotipo miocárdico de trabajo (49). Las regiones del corazón tubular que se expanden para la formación de las cámaras cardíacas, lo hacen por medio de un proceso expansivo que asemeja a la manera como se infla un globo (25).

Para la formación de los atrios, particularmente el atrio izquierdo, se requiere del desarrollo pulmonar y de sus respectivos vasos. Concomitante a los cambios producidos por la aparición de estos órganos, las paredes supralaterales del

componente atrial del corazón tubular se expanden hacia ambos lados del tracto de salida, dando forma a los apéndices atriales, produciendo el primer cambio morfológico que diferencia el lado izquierdo, del derecho en el atrio primitivo (25).

El apéndice del atrio derecho es amplio, permitiendo la incorporación del seno venoso, localizándose entre el apéndice y el septum primario en desarrollo. El apéndice del atrio izquierdo se continúa distalmente con el vestíbulo del atrio derecho, que se origina por la inclusión de musculatura del canal atrioventricular a los atrios en desarrollo (25, 157) de manera similar, parte del canal atrioventricular se incorpora al atrio izquierdo definitivo originando el vestíbulo de la válvula mitral, también en este se evidencia un aporte sustancial por parte del componente atrial del tubo cardiogénico primitivo a la cámara definitiva (25, 157). El componente venoso pulmonar posterior a la septación se expande para formar el techo del atrio izquierdo, produciendo eventualmente su conformación definitiva con cuatro aperturas venosas (109).

Los ventrículos se derivan del bucle ventricular, cuya porción inicialmente se deriva del tallo del tubo cardiogénico tubular; este proceso genera la curvatura interna y externa ventricular. Los segmentos apicales de los dos ventrículos se expanden desde la curva externa, con la parte de entrada del tubo primario dando origen a la parte apical del ventrículo izquierdo, y la parte de salida al componente apical del ventrículo derecho (158-160). Las trabeculaciones de estas dilataciones son las que eventualmente les dan a los ventrículos su morfología distintiva (25).

A diferencia de los atrios, las diferencias morfológicas de los ventrículos no son representativos de una asimetría izquierda-derecha. Estos reflejan el desarrollo espacio-temporal, y en serie, dentro del componente ventricular del tubo cardiaco primario (25). Los cambios que ocurren dentro de la curvatura interna permiten que cada segmento apical alcance su respectivo componente de entrada y salida. Cuando la expansión de los componentes apicales comienza, las paredes del canal atrioventricular se unen de manera casi exclusiva al ventrículo izquierdo en desarrollo, mientras que el componente de salida del tubo cardiaco es apoyado casi en su totalidad por el ventrículo derecho en desarrollo (25, 161).

Se han descrito procesos de remodelación del segmento ventricular de la curvatura cardiaca interna, lo que permite su unión con el canal auriculoventricular proximalmente y el componente de salida distalmente. Este proceso permite la separación de los atrios; y la división del tracto de salida, que se comparten entre los componentes apicales de los ventrículos en desarrollo. La pared del atrio derecho en desarrollo es continua con la curvatura interna desde su inicio, debido al plegamiento primario con la pared del tracto de salida (25). Para que exista continuidad entre la cavidad del atrio derecho, con aquella del ventrículo derecho, se requiere la expansión del canal atrioventricular. Posterior a la expansión, y concomitantemente con el desarrollo del plano que aísla las cámaras atriales y ventriculares, el tejido muscular del lado derecho del canal atrioventricular se incorpora al atrio derecho, originando el vestíbulo de la válvula tricúspide (157). La

cavidad del atrio izquierdo es continua con la del ventrículo izquierdo desde el inicio del desarrollo. Para culminar el desarrollo del ventrículo izquierdo se requiere que la mitad proximal al tracto de salida primitivo se transfiera de su localización inicial, sobre el ventrículo derecho en desarrollo, para formar el vestíbulo aórtico. La porción remanente del tracto de salida dará origen al infundíbulo subpulmonar (25).

Son varios los genes transcripcionales asociados a la formación de las cámaras cardiacas. Uno de los primeros genes específicos de cámara expresados es el gen *Nppa*, que codifica para el factor natriurético atrial, marcador de alta proliferación y de expansión del tejido cardiaco de cámara (162). Otros factores de transcripción requeridos durante la regulación de la morfogénesis de las cámaras cardiacas son *Hand1*, *Irx4* and *Irx5*, *Nkx2-5*, *Gata4*, *Tbx2*, *Tbx3*, *Tbx5* y *Tbx20*; estos regulan otros genes, como aquellos que codifican las proteínas de unión gap *conexina 40* (*Cx40*) y *conexina 43* (*Cx43*) (25, 140). *Nppa* no se expresa en el tubo cardiogénico primitivo, o en las células miocárdicas primarias del corazón que desarrolla cámaras, lo que podría deberse por la activación de un programa genético de cámara específico o la inhibición de la formación de cavidades en el miocardio primario (49). Los factores de transcripción cardíacos funcionan en paralelo como cofactores para formar complejos transcripcionales multiproteína que regulan la diferenciación y especificación localizada de células miocárdicas (163, 164).

Nkx2.5 se expresa ampliamente en las células progenitoras cardíacas y en miocardio (88), sin embargo, modelos animales con embriones de ratones deficientes de Nkx2.5, han demostrado que el corazón tubular persiste su desarrollo normal, sin embargo, estos no realizan el proceso de bucle cardíaco y formación de cámaras (165, 166). Por lo que se considera a Nkx2.5 crucial para el desarrollo del tubo cardiogénico y las cámaras cardíacas, pero redundante durante las fases tempranas de la cardiogénesis (49).

Nkx2.5, Gata4 y Tbx5 se expresan tanto en el miocardio primario, como el miocardio de trabajo. Tbx5 se expresa predominantemente en el mesodermo venoso precárdico, tracto de entrada, canal atrioventricular, y en el ventrículo embrionario (167, 168); Tbx20 se expresa a lo largo del tubo cardíaco, y en embriones de ratones knockout, estos evidencian signos de parada en el desarrollo de sus cámaras (63, 169 -171). Otros factores como Tbx2 y Tbx3, se expresan predominantemente en células del miocardio primario (144, 172, 173), Tbx2 tiene un efecto restrictivo durante el desarrollo de las cámaras cardíacas, que depende de la acción cooperativa entre éste y Nkx2.5 (49, 148).

Estudios adicionales han sugerido que Tbx2 y Tbx3 inhiben individualmente la diferenciación del miocardio cardíaco en miocardio de trabajo (144, 172). Pero también actúa de manera redundante al reprimir la morfogénesis de cámara e induce la formación de cojinetes endocárdicos (145). La expresión de Tbx2 en el

tubo cardiogénico primitivo es reprimida por Tbx20, el cual se une a Smad1 y Smad5, previniendo la formación de los complejos Smad-proteína que activan la expresión de Tbx2 (174). Aunque la inhibición transcripcional de Tbx2 y Tbx3 depende de su capacidad de unión al ADN, otros inhibidores han sido reportado que interactúan con deacetilasas de histonas, y su efecto regulador sobre la formación de cámaras depende de modificaciones en las histonas (175). Esto sugiere los múltiples niveles de complejidad en la morfogénesis cardíaca y especificación en las células miocárdicas (49).

Otro de los reguladores transcripcionales descritos con un rol importante en la morfogénesis de cámaras es Pitx2. La expresión de Pitx2 cambia dinámicamente durante la cardiogénesis, particularmente en el paso de tubo cardíaco simétrico a un corazón con cavidades (133). Durante las primeras etapas del tubo cardiogénico la expresión de Pitx2 se encuentra restringida a la porción izquierda cardíaca, como fue previamente mencionado en lateralidad durante el desarrollo del bucle cardíaco. La expresión diferencial izquierda-derecha se mantiene durante el desarrollo de las cavidades atriales, sin embargo, esta se transforma en una expresión diferencial dorso-ventral durante el desarrollo ventricular. Expresión ectópica de Pitx2 ha sido asociada en modelos animales con CHD que incluyen ventrículo derecho con doble tracto de salida, y transposición de grandes arterias (133, 176).

Diferentes estudios han demostrado los roles específicos de Pitx2 en el desarrollo de las cámaras cardíacas. Tessari y colaboradores, demostraron que Pitx2 es requerido en la cavidad atrial izquierda para inhibir la expresión de Bmp10, mientras que en la cavidad ventricular ayuda a determinar en los miocitos el rol de la arquitectura miofibrilar. Mommersteeg y colaboradores, revelaron el rol crítico de Pitx2 en la morfogénesis del polo venoso del corazón, al ser este requerido para la proliferación inicial y expansión posterior de los precursores miocárdicos de la vena pulmonar, y su acción coordinada con Nkx2.5 y Pitx2c para la formación del retorno venoso pulmonar (134, 146).

### **3.9. Desarrollo del marcapasos y Sistema de conducción cardíaco.**

Los componentes requeridos para iniciar, conducir, y propagar el potencial de acción necesario para la contracción sincronizada de la bomba cardíaca son las células marcapasos, y el sistema de conducción. Todos estos, exceptuando por las fibras de Purkinje, presentan en sus características primarias componentes similares a aquellos encontrados en el miocardio embrionario primitivo, como: ricas en glicógeno, estructuras sarcoméricas pobremente desarrolladas, y menor número de mitocondrias (49).



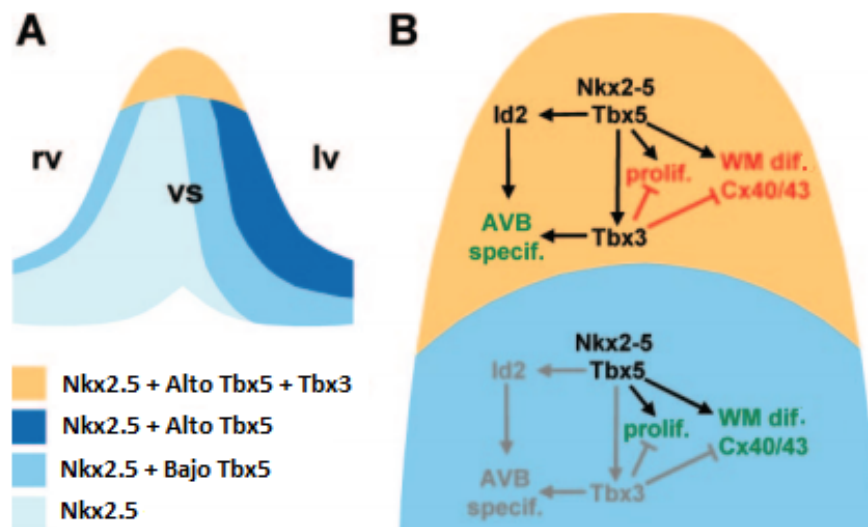
Durante el proceso de formación de las cámaras cardíacas, un grupo de células de miocardio primario mantienen su fenotipo embrional para dar origen al futuro nodo sinusal, nodo atrioventricular, y la asa atrioventricular con sus respectivas ramas (140). Para poder dar origen, y diferenciar este tejido para su función específica de conducción y actividad de marcapasos se requiere de una red intrincada de proteínas regulatorias (49, 177, 178).

El nodo sinusal es el marcapasos dominante en el corazón, y se origina de precursores celulares que expresan Tbx18, pero son negativos para Nkx2.5. Estos precursores se adicionan al corazón tubular formando el seno venoso (146,179, 180). En el corazón embrionario, el seno venoso en su totalidad expresa Hcn4, un canal de hiperpolarización de potasio activado por nucleótidos cíclicos, proteína esencial para la función de marcapasos en el corazón maduro (181), que permite iniciar el impulso eléctrico en la totalidad de esta estructura (Ver figura 9.) (49, 146).

A parte de Hcn4, también se cuenta con la participación del factor de transcripción homoeodominio Shox2, que permite delimitar la región del primordio del nodo sinusal mediante la inhibición de Nkx2.5, permitiendo la expresión de Hcn4 y de Tbx3 (146,182, 183). Este último inicialmente reprime la expresión de genes de miocardio de trabajo y subsecuentemente inicia el programa génico de marcapasos. Tbx3 se expresa en el nodo sinusal en desarrollo, pero no se

evidencia en el miocardio atrial circundante o en el miocardio del seno venoso (172, 184). Tbx 3 y Tbx5 regulan diferentes aspectos del sistema de conducción mediante la unión covalente a genes promotores de canales de sodio cardíacos, como Scn5a y Scn10a, los cuales son necesarios para la excitabilidad cardíaca (Ver figura 9.) (49, 164, 185).

Durante las etapas tempranas del desarrollo del nodo sinusal, Tbx18 permite el desarrollo de la cabeza y cola del nodo a partir de células mesenquimatosas (180), posteriormente la actividad de marcapasos se propagará al nodo y asa atrioventricular. En el embrión el canal atrioventricular es el encargado de retrasar la propagación del impulso, similar al nodo atrioventricular en el corazón maduro (140). Molecularmente, el canal atrioventricular se caracteriza por expresar Tbx2/Tbx3, pero es negativo para Cx40 y Nppa, y conforme a este rol temprano se ha evidenciado que el perfil de expresión génica del canal atrioventricular embrionario, y del nodo atrioventricular fetal presentan similitudes en su programación, indicando que el programa específico molecular del canal atrioventricular se mantiene en el nodo atrioventricular (49,186).



**Figura 9. Modelo haz atrioventricular y especificación sistema de conducción.** A. Perfiles de expresión de reguladores del haz atrioventricular y ramas conductoras. B. Mecanismo de especificación en la cresta del septum ventricular. Tbx5 y Nkx2.5 estimulan el miocardio de trabajo a proliferar y diferenciarse. Tbx5 actúa como activador de Tbx3, y Nkx2.5 como co-factor para Tbx5 y Tbx3. Tbx5 y Tbx3 compiten en la represión o activación de la diferenciación en miocardio de trabajo, Id2 actúa independientemente de Tbx3, sin embargo, independientemente no es suficiente para reprimir la diferenciación y proliferación. AVB: Haz atrioventricular, WM: Miocardio de trabajo, rv: Ventriculo derecho, lv: Ventriculo izquierdo, vs: Septum ventricular. - Gráfico original de Bakker y col. (2008), modificado por autor (191).

En el corazón embrionario, la activación ventricular sigue un patrón que inicia del canal atrioventricular dorsal Cx40-negativo, continuando por el miocardio trabecular en desarrollo Cx40-positivo (187, 188). En etapas posteriores, tanto el asa atrioventricular, como sus ramificaciones, y las fibras de Purkinje inician la expresión de Cx40 (189, 190). La especificación del asa atrioventricular requiere de la participación de varios factores de transcripción que incluyen Tbx5, Nkx2.5, Id2, Irx3, y Tbx3 (191, 192). Tbx3 inhibe el programa de miocardio de trabajo en el

asa atrioventricular en desarrollo, sin embargo, posteriormente requiere de la activación de genes para la rápida conducción, incluyendo Cx40, que se activará gradualmente en estas células durante el periodo fetal, a pesar de la presencia de Tbx3 (49, 191).

Estudios recientes han evidenciado el impacto de Pitx2c en el desarrollo del programa de expresión del nodo sinusal, en la unión sinoatrial derecha, pero no en su porción izquierda. En la ausencia de Pitx2, se ha evidenciado en modelos animales, el desarrollo de cavidades atriales con características de lateralidad derecha bilaterales, incluyendo la aparición de dos nodos sinusales. Este estudio demostró que la expresión de Nkx2.5 se requiere para limitar la expresión de Tbx3 en el nodo sinusal en desarrollo, y que la expresión asimétrica de Pitx2c permite la expresión de un programa génico de diferenciación de lateralidad izquierda-derecha, por lo tanto, Pitx2 hace parte del grupo de factores transcripcionales que restringen la actividad marcapasos en el corazón en desarrollo (134,193).

Otros estudios como los realizados por Rentschler y colaboradores en el 2012, demostraron que señales Notch promueven la expresión de genes específicos del sistema conductor en cardiomiocitos neonatales, reprogramándolos en células con características electrofisiológicas de células de conducción (49, 194).

### **3.10. Trabeculación del miocardio ventricular**

Los procesos de trabeculación y posterior compactación del miocardio ventricular facilitan la septación de las cámaras cardíacas, permite una mayor contractibilidad y conductividad, al igual que ayuda a establecer el sistema coronario en el corazón en desarrollo (195-199). Señales paracrinas entre el endocardio y el miocardio en desarrollo son esenciales para la formación de las crestas musculares que recubren la pared ventricular, proceso que toma lugar al final del plegamiento cardíaco (25).

El principal factor molecular que regula la transición endocardio-miocardio en la trabeculación es Notch1 (196, 200). Cuando el dominio extracelular de Notch1 se une con los ligandos Delta4 y Jagged, procesos de clivaje proteolítico permiten la liberación del dominio intracelular N1ICD al citoplasma (200), el cual se asocia con el cofactor transcripcional RBPJK y se desplaza al núcleo (201, 202). En el núcleo el complejo N1ICD/RBPJk aumenta la expresión de BMP10 miocárdico, estimulando la proliferación de este al inhibir la actividad de P57kip2 (inhibidor del ciclo celular) y aumentando la actividad de Tbx20 y Hey2 (203,204). Notch1 promueve el crecimiento del miocardio trabecular, y estimula la actividad de neuregulina–1 (Nrg1) a través de EphrinB2 (196). Nrg1 es uno de los factores de crecimiento producidos por el endocardio, este se une al receptor miocárdico de tirosina quinasa ErbB4, lo que lleva a su dimerización con ErbB2, activando

cascadas de señalización que modulan el crecimiento celular y migración (205). Liu y colaboradores determinó que ErB2 actúa como factor dual en la proliferación de cardiomiocitos y delaminación direccional durante la trabeculación ventricular (206). Se sugiere que la trabeculación puede contribuir simultáneamente a la contractibilidad cardíaca, mientras responde al aumento de flujo sanguíneo (57, 207).

La señalización de factores de crecimiento desde el miocardio hasta el endocardio juega un papel fundamental al mantener la trabeculación. Factores de crecimiento como el factor de crecimiento vasculoendotelial (VEGF), y la angiopoyetina 1; los cuales en modelos animales han demostrado como su deficiencia genera falla cardíaca y posterior letalidad por la no trabeculación miocárdica, y su sobreexpresión produce hipertrabeculación, con la presencia de zonas compactas atenuadas (200, 208, 209).

La comunicación entre endocardio y miocardio puede ser moderada o complementada por la gelatina cardíaca (matriz extracelular entre dos capas). Durante la séptima semana de desarrollo, la expresión de ácido hialurónico sintasa-2 (Has-2) contribuye al desarrollo de matriz extracelular, mientras que su deficiencia se manifiesta con paredes ventriculares compactas con falta de trabeculación (210). Un ejemplo de posible mecanismo por medio del cual Has2

regula la trabeculación es mediante la activación de ErbB2/3 en la mesénquima de la formación de cojinetes cardíacos (211). En etapas posteriores del desarrollo, la metaloproteinasa ADAMTS1 elimina la gelatina cardíaca mediante el clivaje de versican, un proteoglicano extracelular de matriz, que promueve la proliferación celular por lo que la expresión de ADAMTS1 señala el fin del crecimiento trabecular (212,213). Otro ejemplo de comunicación entre endocardio y miocardio por gelatina cardíaca se presenta en el desarrollo del sistema conductor cardíaco, en donde señales endocárdicas promueven la expresión de Cx40 en el miocardio y la gelatina cardíaca cumple el rol de regular la intensidad de estas señales moleculares (57, 214).

### **3.11. Regulación epigenética del desarrollo cardíaco**

Varios factores epigenéticos han sido asociados como críticos en los procesos para modular la especificación del linaje y la morfogénesis cardíaca durante la cardiogénesis. Dentro de los reguladores epigenéticos se incluyen modelos de modificación de histonas, complejos de remodelación de ATP dependientes de cromatina, y metilación de ADN. Cada uno de estos modelos de regulación influyen la expresión génica mediante cambios en el acceso de las secuencias reguladoras de ADN a sus respectivas proteínas de unión, aportando de esta manera un nuevo nivel de complejidad al control de la expresión génica durante el desarrollo cardíaco (57).

El efecto de la modificación covalente a las proteínas histonas altera las interacciones ADN-histona, permitiendo la presencia de regiones de la cromatina que son más accesibles o más restringidas. El mecanismo de acetilación de histonas promueve la activación transcripcional al permitir mayor accesibilidad a la cromatina. Modelos murinos han evidenciado el rol de la histona acetiltransferasa (HAT), ratones con pérdida global de la función de HAT fallecen durante el desarrollo debido a defectos cardíacos severos, probablemente causados por la acetilación de GATA4 (215,216). Adicionalmente ratones que carecen de HAT *Moz* presentan anomalías del arco aórtico y defectos del septum ventricular similares a los encontrados en síndromes por delección 22q11 por disminución en la acetilación, reduciendo la expresión de TBX1 (217,218), sin embargo, hasta el momento no se conoce el efecto de HAT en la cardiogénesis humana.

Opuesto a HAT existen las histonas deacetilasas (HDACs), quienes cumplen la función de remover los grupos acetilo de las histonas, permitiendo la formación de cromatina condensada, inhibiendo la transcripción. Diferentes modelos han evidenciado que la pérdida de Hdac1 o Hdac2 no repercute de manera significativa en la cardiogénesis, pero en doble-knockouts de Hdac1 y Hdac2 se presenta muerte en el periodo neonatal por arritmia cardíaca o cardiomiopatía dilatada (219). También se cree que la acción de las deacetilasas no se limita a la modificación de histonas, en algunos casos, como con Hdac2, quien en conjunto a



Hopx limitan la proliferación miocárdica produciendo la deacetilación de Gata4 disminuyendo su actividad transcripcional (220, 221).

A diferencia de los procesos de acetilación de histonas, el efecto de la metilación de histonas es residuo dependiente. Metilación de la histona H3 en la lisina 4, 36, y 79 causan activación génica; mientras que la metilación en la lisina 9 y 27 causan silenciamiento. Las HDACs y HAT juegan un rol crítico en el desarrollo cardíaco, mutaciones *De novo* en genes asociados a la regulación de histonas han sido evidenciados en pacientes con CHD no familiar (222). Pérdida de función de la metiltransferasa Smyd1 causa hipoplasia ventricular derecha, por posible disminución en la expresión de Hand2, Irx4 (223). Estudios recientes de análisis de genoma completo sobre los patrones de metilación del ADN en corazones de ratones evidenciaron enriquecimiento en los genes reguladores cardíacos como Wnt2, Fgf2; y factores de transcripción como Gata6 y Mef2c (224).

Otros factores epigenéticos que influyen la transcripción en la cardiogénesis son el grupo de proteínas nucleares de alta movilidad (HMG) y los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP. El primer grupo remodela la estructura de la cromatina formando complejos multiproteína con sitios promotores o enhancers, permitiendo la activación transcripcional de sus genes objetivo (225, 226). De estos HMGA2 ha evidenciado jugar un rol importante en la diferenciación cardíaca in vivo e in vitro, su sobreexpresión promueve la diferenciación de cardiomiocitos y su inhibición bloquea este proceso (225). También HMGA2 es

blanco de Nkx2.5 favoreciendo sinérgicamente la actividad de este, en la presencia de estimulación de BMP, mediada por Smad y elementos de unión a (225, 226).

En el grupo de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP en la actualidad se conocen cuatro familias, sin embargo, la familia SWI/SNF es la mejor estudiada en asociación al desarrollo cardíaco. Dentro de esta familia el factor asociado a Brg1/Brm (BAF) ha sido asociado con diversos factores de transcripción cardíacos como Nkx2.5, Gata4, Tbx5, y Tbx 20 (57, 227,228).

La subunidad ATPasa del complejo BAF es codificada por los genes homólogos Brg1 o Brm, siendo Brg1 indispensable para formar el complejo (229-231). Brg1 actúa en el complejo BAF aumentando la accesibilidad del promotor a los factores de transcripción, o uniéndose directamente a factores de transcripción como las proteínas Gata (232). Modelos murinos con haploinsuficiencia global de Brg1 presentan un amplio espectro de defectos cardíacos que varían de leves defectos septales, hasta alteraciones en la conducción (233-235). En el ratón Brg1 activa la cadena pesada  $\beta$ -miosina ( $\beta$ -MHC) expresada en los miocitos fetales, mientras inhibe  $\alpha$ -MHC expresada en los miocitos adultos (236). Aunque Brg1 es silenciado en ratones adultos, Brg1 se reactiva en miocitos adultos bajo estrés cardíaco induciendo el cambio de  $\alpha$ -MHC a  $\beta$  –MHC, sugiriendo un rol manteniendo los miocitos en estado embrionario (236, 237). Brg1 también promueve la proliferación miocárdica mediante la estimulación de Bmp10 (236); por lo tanto, la dosis

adecuada de Brg1 es crítica para el desarrollo normal del corazón, la modificación del balance entre Brg1 y factores de transcripción cardíacos como Tbx5, Tbx20, y Nkx2.5 causan CHD severas (228).

Baf60c es la subunidad específica cardíaca del complejo BAF que se expresa temprano en el desarrollo y es requerida para la inducción ectópica de la diferenciación de cardiomiocitos, en combinación con Gata4 y Tbx5 (238). Baf60c es codificada por el gen Smarcd3, cuyo ARNm (en compañía de Baf60a y Baf60b) es inhibido en el corazón durante su desarrollo temprano, indicando la especificidad de tejido de Baf60c durante el desarrollo embrionario (231, 239). Baf60c también coopera con Tbx5 para iniciar activación de sus genes blancos para la formación del PHF (238, 240) y su deficiencia ha sido asociada con acortamiento del tracto de salida, hipoplasia ventricular y atrial derecha, y ausencia del canal atrioventricular (227, 239). Baf60a participa en la unión de del receptor de glucocorticoides al complejo BAF, y actúa en la actividad transcripcional mediada por c-fos/c-jun. El Rol de Baf60b no es claro, sin embargo, se ha evidenciado que es ubiquitinado específicamente por Unkempt, y se cree que su acción tiene que ver con mantener la estequiometría del complejo SWI/SNF (226).

Otro complejo que actúa en la regulación epigenética de la cardiogénesis es el complejo NuRD, que contiene deacetilasas de histonas que actúan como inhibidores transcripcionales (241). El complejo Nurd presenta funciones diversas

que ocurren como resultado de su ensamblaje variable, y su actividad ATPasa sucede como resultado de 2 proteínas Mi-2, CHD3 y CHD4 (242). El complejo NuRD se asocia con la metiltransferasa del candidato 1 del síndrome Wolf – Hirschhorn (Whsc1) e interactúa con el factor Sall4, el cual se asocia con el desarrollo del septum ventricular, insinuando su rol en la cardiogénesis (243,244).

Por último, dentro de los reguladores epigenéticos de la cardiogénesis también se incluyen los MicroARN (miRs), estos son secuencias cortas de 19-25 nucleótidos capaces de unirse de manera complementaria a ARNm, reprimiéndolos y marcándolos para degradación (246). La expresión de miR-1 y miR-133 aumenta durante el desarrollo embrionario hasta la etapa neonatal, presentando en niveles significativamente menores en la edad adulta (246, 247). En *Drosophila* la pérdida de miR-1 son letales afectando severamente genes musculares como el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (246), y entre sus objetivos se incluyen genes esenciales para el desarrollo cardíaco como HDACA4 (inhibidor de la expresión génica de músculo esquelético), Hand2, GJA1, y KCNJ2 (246, 248- 250).

miR-133 exhibe un efecto opuesto a miR-1, estimulando la proliferación e inhibiendo la expresión de miogenina y MHC (246). En los modelos animales la pérdida de miR-133 no es letal en todos los afectados, como en el caso de miR-1, sin embargo, en aquellos sobrevivientes (aproximadamente 24%) se evidencian signos de fibrosis, alteraciones de la contractibilidad cardíaca, cardiomiopatía, y proliferación aberrante (251). Dentro de las secuencias objetivo de miR-133 se

incluyen la ciclina D2 y el factor de respuesta a suero (SRF) (246). Otros miR asociados a la diferenciación cardíaca son MiR-499, inhibidor de SOX6 y estimulador de la diferenciación en cultivos de progenitores de cardiomiocitos (253, 254); miR-206 y miR-208, los cuales han sido asociados a los procesos de fibrosis y crecimiento hipertrófico (250, 253).

### **3.12. Generalidades de la tetralogía de Fallot**

La tetralogía de Fallot es la cardiopatía congénita cianosante más frecuente reportada, esta se caracteriza por presentar una importante heterogeneidad clínica y genética. Esta condición afecta del 3% al 10% de recién nacido con cardiopatías congénitas (1, 254, 255).

Las primeras descripciones de la tetralogía de Fallot se le atribuyen a Niels Stenson en 1671, quien describió la condición en un feto con esternón bífido, onfalocele, sindáctila y paladar hendido; sin embargo, William Hunter en la escuela de medicina del hospital de St Georges en Londres fue el primero en hacer una descripción ilustrada de la condición en 1784 (254-256). Autores como Farre en 1814 (258), Peacock en 1866 (259) y Von Rokitansky en 1875 (260) describieron la condición, sin embargo, no fue hasta 1888 que Etienne-Louis Fallot en su publicación *“L’anatomie pathologique de la maladie bleu”* refinó las descripciones de Hunter, refiriendo una lesión que asociaba la comunicación interventricular, estenosis subpulmonar, origen biventricular de la aorta e hipertrofia del ventrículo

derecho (261, 262). Finalmente, en 1924 el canadiense Maude Abbott acuñó el término tetralogía de Fallot, a la tétrada de (I) defectos del septum ventricular, con (II) aorta cabalgante, (III) obstrucción del tracto de salida ventrículo derecho, e (IV) hipertrofia ventricular derecha; debido a que consideraba esta designación más conveniente a una lista de defectos cardíacos (263, 264).

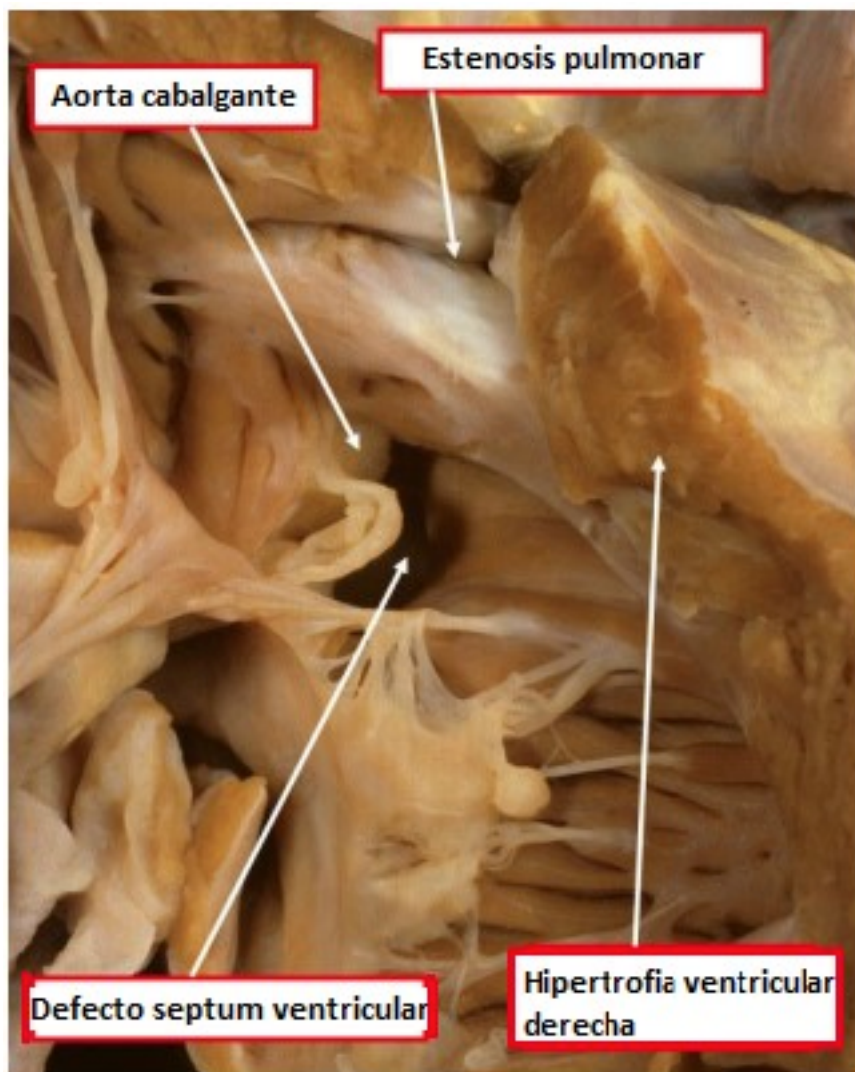
Diferentes estudios indican una prevalencia que varía de 2.8 a 3.9 por 10.000 nacidos vivos, afectando de igual manera a diferentes poblaciones sin distinción de género, raza u origen étnico (1, 254, 265-270). La mayoría de los casos de TOF son esporádicos, sin embargo, el riesgo de recurrencia en hermanos es del 3% en casos donde no hay antecedentes de familiares afectados en primer grado (254). La sobrevida sin tratamiento quirúrgico durante el primer año de vida es del 66%, y solo el 6% llega a los 30 años de vida. Con manejo quirúrgico la sobrevida a la adultez aumenta por encima del 85% (271).

### **3.13. Anatomía de la tetralogía de Fallot**

La tetralogía de Fallot es un defecto conotruncal que puede ser diagnosticada por la presencia contemporánea de cuatro defectos cardíacos clásicos (Ver figura 10.):

1. Estenosis pulmonar infundíbular (Obstrucción en el tracto de salida del ventrículo derecho).
2. Comunicación interventricular (Defecto del tabique interventricular).
3. Dextraposición de la aorta (Aorta cabalgante o Aorta a caballo).
4. Hipertrofia ventricular derecha.

Sin embargo, la base embriológica para la aparición de esta condición requiere de la desviación antero-cefálica anormal del septum ventricular del tracto de salida en desarrollo, y del desarrollo morfológico anormal de las trabeculaciones del septoparietal que enrollan el tracto de salida subpulmonar (265). El efecto combinado del septum de salida desviado y las trabeculaciones hipertróficas septoparietales producen la obstrucción del tracto de salida del ventrículo derecho clásico en TOF (265). La desviación del septo de salida muscular es también responsable de crear un defecto del tabique interventricular por mal alineamiento, obteniendo como resultado el cabalgamiento de la aorta (265). La hipertrofia del miocardio ventricular derecho ocurre como consecuencia de la alteración hemodinámica creada por las lesiones originadas por el septo del tracto de salida desviado (265).



**Figura 10. Autopsia corazón con tetralogía de Fallot.** Espécimen con apertura de la pared anterior del ventrículo derecho, evidenciando hallazgos típicos de la tetralogía de Fallot. - Imagen original de Bailliard y col. (2009), modificado por autor (265).



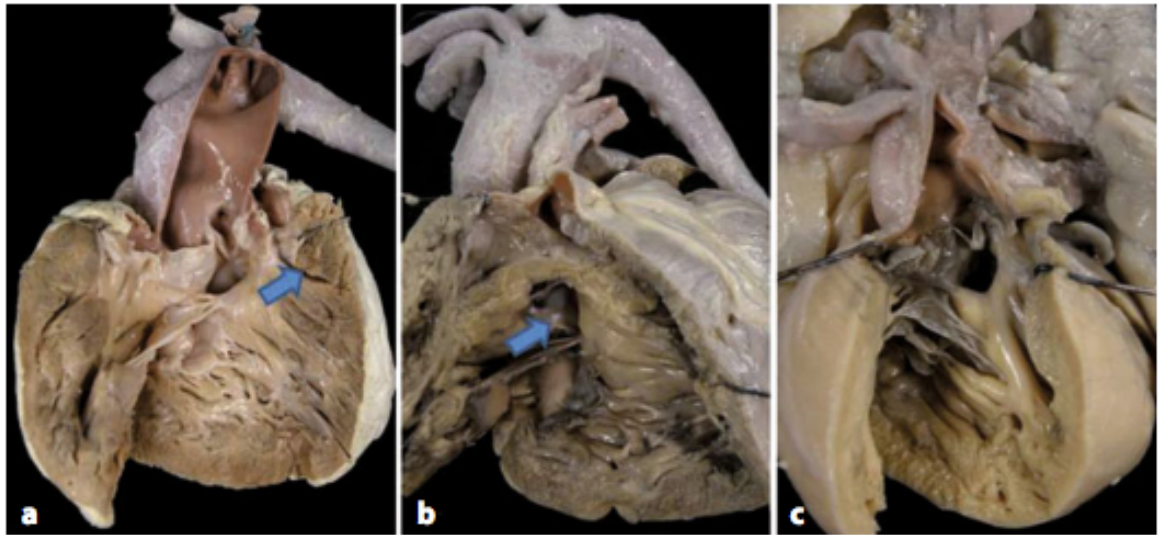
### **3.13.1. Defecto del tabique interventricular**

El defecto del tabique interventricular subaórtico que produce la comunicación interventricular presente en TOF, ocurre como resultado directo de la mala alineación cefálica de la porción muscular del tracto de salida del tabique ventricular, o de sus remanentes fibrosos en el caso de que los cojinetes endocárdicos del tracto de salida, si estos fallan en muscularizarse durante el desarrollo embrionario (265).

El tamaño de los VSD pueden variar entre individuos afectados, sin embargo, generalmente sus dimensiones son grandes. El tipo más frecuente es el defecto perimembranoso, que se evidencia en aproximadamente 80% de los casos, y se caracteriza por una continuidad fibrosa entre las válvulas tricúspide, mitral y aórtica en su anillo postero-inferior; este defecto involucra el septum membranoso parcialmente o en su totalidad, extendiéndose al septum muscular (264). En el 20% restante de pacientes afectados el defecto es muscular, en donde todos los bordes son musculares y no hay una continuidad fibrosa entre la aorta y la válvula tricúspide en el borde postero-inferior del defecto (Ver figura 11.) (254, 265).

Un tercer tipo de defecto identificado se caracteriza por la presencia de un borde antero-superior compuesto de un rafe fibroso entre las cúspides de las válvulas

aortica y pulmonar (265). Este tipo de defecto es infrecuente en individuos caucásicos, y se evidencia más en individuos de Centro América, Sur América y Asia (265). En este caso el septum del tracto de salida falla en desarrollarse, y se clasifica como subarterial o doblemente comprometido, por su localización en una posición subaórtico y subpulmonar (265). Este tipo de defecto puede definirse como perimembranoso o muscular, acorde a la morfología de su borde postero-inferior (254). En esta alteración se evidencia un remanente del tracto de salida, el cual se presenta como un rafe fibroso por debajo de las cúspides unidas de las valvas arteriales, causando obstrucción del flujo del tracto de salida (265, 272-273). El VSD También puede extenderse dentro del componente de entrada del ventrículo en presencia de un defecto del septum AV o en asociación con mal-alineamiento entre el atrio y las estructuras septales ventriculares extendiéndose o sobrepasando la válvula tricúspide (265).



**Figura 11. Defecto del tabique interventricular.** A. Hipoplasia extrema del infundíbulo subpulmonar (Flecha). B. Defecto muscular infundíbular ventricular (Flecha). C. Defecto ventricular subarterial.- Imagen original de Frescura y col. (2012) (264).

### 3.13.2. Estenosis pulmonar

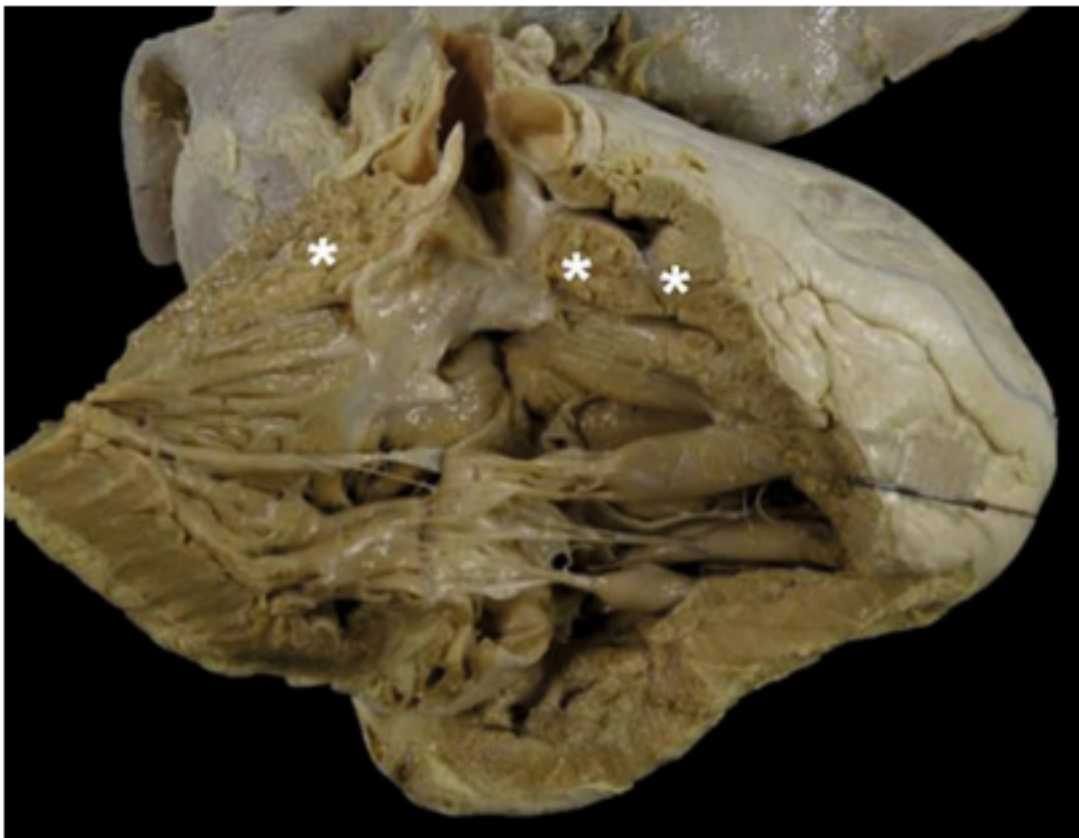
En la TOF el estrechamiento del infundíbulo subpulmonar es causado por la desviación septum del tracto de salida y la alteración morfológica de las bandas septo-parietales, las cuales refuerzan la pared parietal del ventrículo derecho (20, 264, 265, 273, 274). El área subpulmonar muscular obstruida es considerada una entidad dinámica, debido a que el grado de estenosis puede ser exacerbado por catecolaminas, o por un estado de bajo volumen intravascular, predisponiendo a los afectados a episodios súbitos y agudos de desaturación (265, 275, 276).

Los corazones de pacientes con TOF exhiben bandas septo-parietales anormalmente hipertróficas que contribuyen a la obstrucción subpulmonar, esta obstrucción del flujo hacia los pulmones frecuentemente se extiende más allá del mismo tracto subpulmonar (Ver figura 12.) (264, 265).

Diferentes estudios han descrito como el infundíbulo subpulmonar se encuentra poco desarrollado, y se observa morfológicamente estrecho; sin embargo, estudios anatómicos y ecográficos describen que esta estructura es significativamente más larga que en el corazón normal; y que la mala alineación del septum del tracto de salida en TOF es una estructura mucho más prominente a la descrita en aquellos no afectados (274, 277-280). Ocasionalmente se encuentran casos en donde el infundíbulo subpulmonar es hipoplásico, particularmente en aquellos casos de TOF que se acompañan por atresia pulmonar (264).

El grado de desviación del septum de salida también afecta el crecimiento de las arterias pulmonares, presentando una correlación linear entre el grado de obstrucción y el grado de desarrollo del árbol pulmonar arterial (280). La válvula pulmonar puede ser hipoplásica y/o estenótica, con valvas morfológica y funcionalmente anormales, a las cuales se le han descrito diferentes variantes morfológicas que incluyen: válvula con tres cúspides estenóticas, apariencia con forma de cúpula unicomisural, o más frecuentemente, como una válvula estenótica

bicúspide y displásica (280, 281). La lesión valvular, rara vez es la mayor causa de la obstrucción, y estrechamiento adicional del infundíbulo subpulmonar es a menudo debido a acumulaciones superpuestas de tejido fibroso en el endocardio (264). Adicionalmente se describen otras áreas focales de estrechamiento entre las cuales se incluyen el tronco de la pulmonar, y las arterias pulmonares derecha e izquierda (265, 282).



**Figura 12. Estenosis pulmonar.** Estenosis subpulmonar causada por desviación del septum del tracto de salida, e hipertrofia severa de las bandas septo-parietales (\*). - Imagen original de Frescura y col. (2012) (264).

### **3.13.3. Dextraposición de la aorta**

Debido al desplazamiento causado por el mal alineamiento del septum de salida hacia el ventrículo derecho, la raíz aortica es forzada a desplazarse por encima del septum muscular ventricular (265, 283,284). En el corazón normal, las cúspides de la válvula aortica se encuentran adheridas exclusivamente al ventrículo izquierdo y a la continuidad fibrosa que existe entre la valva anterior mitral, la coronaria izquierda, y las cúspides aórticas posteriores no coronarias (Ver figura 13) (264, 285). Cuando el septum subaórtico ventricular es deficiente, parte de la circunferencia de la válvula aortica puede ser apoyada por las estructuras del ventrículo derecho (264, 285).

El grado de cabalgamiento es variable, si la aorta es soportada predominantemente por el ventrículo izquierdo (más del 50%), la conexión ventrículo arterial será concordante. Si la aorta es soportada predominantemente por el ventrículo derecho (más del 50%), un doble tracto ventricular de salida se desarrollará. Este doble tracto es considerado como un tipo de conexión ventrículo-arterial, por lo cual no es contrastante con la definición de TOF (20, 264, 273). El ventrículo derecho con doble tracto de salida, con VSD subaórtico se caracteriza porque el origen de las válvulas semilunares es predominantemente

del ventrículo derecho en asociación con el infundíbulo muscular bilateral, y ausencia de continuidad mitral- aorta (264).

En el escenario de obstrucción subpulmonar significativa, cortocircuito a través de la comunicación interventricular será predominantemente de derecha a izquierda, lo que promueve la eyección de sangre desoxigenada a la circulación sistémica. El volumen sanguíneo constante al cuál se ve expuesto la aorta cabalgada, está implicado en la dilatación de la raíz aortica evidenciada en adultos con TOF (265, 283, 284).



**Figura 13. Cabalgamiento de aorta.** Espécimen con tetralogía de Fallot evidenciando cabalgamiento de aorta y defecto septum ventricular perimembranoso. - Imagen original de Frescura y col. (2012) (264).



#### **3.13.4. Hipertrofia ventricular derecha.**

La hipertrofia ventricular derecha ocurre como consecuencia de la obstrucción del tracto de salida del ventrículo derecho y la compensación de la presión sistólica a través de los dos ventrículos debido al defecto no restrictivo del septo ventricular. El grado y la distribución de la hipertrofia derecha pueden ser consecuencia del empeoramiento de la obstrucción subpulmonar, esto debido a que el extremo hipertrófico anterior de la banda septal y las trabeculaciones septomarginales pueden contribuir a la obstrucción muscular. Adicionalmente se reportan casos en donde hipertrofia de la trabécula septomarginal y de las trabeculaciones apicales causan estenosis a nivel proximal del ostium infundíbular, como es evidenciado en los ventrículos derechos de doble cámara (286).

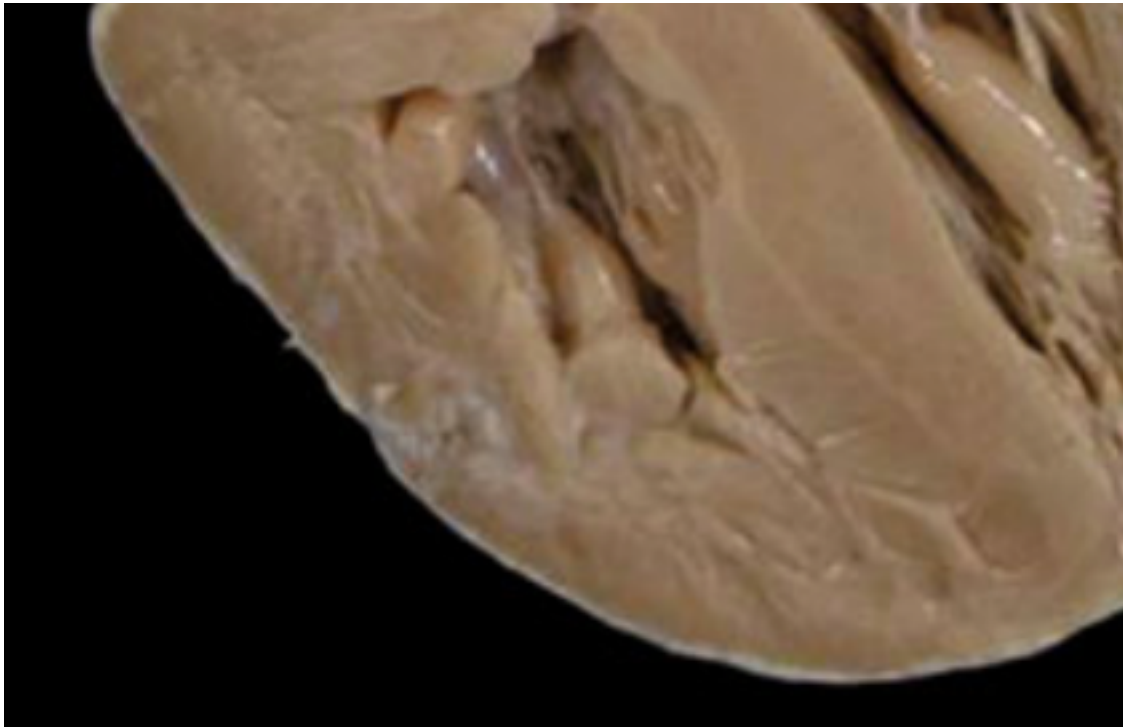
Los pacientes con TOF presentan efectos a largo plazo debido a la sobrecarga ventricular derecha y la presión crónica a la que se ven expuestos. La corrección quirúrgica de TOF produce la transición de una presión severa por sobrecarga a una sobrecarga crónica por volumen, debido al efecto de la disrupción de la válvula pulmonar al momento de la plastia del tracto de salida del ventrículo derecho con parche transanular, causando regurgitación pulmonar residual libre (286, 287). En Adultos con reparación de TOF se reporta el desarrollo de falla ventricular derecha con dilatación de cavidad, disfunción sistólica, fibrosis miocárdica, que causan retención de volumen y sintomatología de falla cardiaca congestiva (Ver figura 14.) (286, 288, 289).

Es poca la información reportada en la literatura sobre los mecanismos moleculares responsables del remodelamiento maladaptativo del ventrículo derecho con sobrecarga, sin embargo, la escasa evidencia sugiere que dichos mecanismos pueden diferenciarse de las vías ya establecidas para el caso del ventrículo izquierdo afectado (288, 289). Modelos animales con sobrecarga ventricular derecha causada por ligamiento de la arteria pulmonar, sugieren que la dilatación y disfunción sistólica es acompañado con aumento en la apoptosis de cardiomiocitos y fibrosis miocárdica extensa (290). Estudios complementarios han aclarado como la presión de la sobrecarga crónica está asociada con una interacción anormal y perjudicial del ventrículo izquierdo al ventrículo derecho, con un movimiento septal anormal que causa un llenado diastólico disminuido del ventrículo izquierdo. Adicionalmente, algunos estudios sugieren que la presencia de elevada presión en el llenado del ventrículo derecho induce reprogramamiento de genes específicos de cámara, los cuales parecen ser diferentes a los observados en modelos animales de sobrecarga ventricular izquierda (291).

Estos hallazgos sugieren, en el contexto de falla ventricular derecha aguda o crónica, que un grupo específico y organizado de genes, y sus productos derivados podrían ser activados o inhibidos. Este tipo de reprogramación génica podría tener un efecto sustancial en la expresión fenotípica de la falla ventricular

derecha, lo que puede representar un objetivo terapéutico para mejorar la prognosis del paciente con falla ventricular derecha (286).

Aquellos afectados por TOF presentan cambios que alteran la capacidad del miocardio ventricular derecho de activar vías génicas que le permiten adaptarse a eventos de hipoxia crónica; a diferencia del ventrículo izquierdo que presenta varios mecanismos que le permiten acomodarse a este mismo escenario, como por medio de la vía inducida por el factor de hipoxia HIF-1, que incluye el aumento en eritropoyesis, angiogénesis mediada por VEGF, aumento de enzimas glicolíticas, y actividad antioxidante persistente (292). Las implicaciones de este tipo de respuesta maladaptativa en el ventrículo derecho a largo plazo son desconocidas (286).



**Figura 14. Hipertrofia ventricular derecha.** Espécimen con tetralogía de Fallot evidenciando hipertrofia ventricular derecha. - Imagen original de Frescura y col. (2012) (264). Modificado por autor.

### **3.14. Anomalías asociadas a tetralogía de Fallot**

Existen otras anomalías cardíacas que pueden asociarse a la TOF, siendo la más severa aquellas relacionadas con atresia pulmonar (293-296). Esta forma extrema de obstrucción pulmonar es la alteración más severa en el espectro de la desviación antero-cefálica del septum de salida. En esta condición los pulmones pueden recibir su suministro por un ductus arterioso persistente, presente en la mitad de los pacientes afectados, o por un aporte multifocal. En estos pacientes, si las arterias pulmonares son confluentes o continuas, el aporte sanguíneo se origina de múltiples colaterales aorto-pulmonares. Si las arterias pulmonares son

discontinuas o ausentes, el aporte vascular se originará de múltiples arterias colaterales, o de una combinación de arterias colaterales y el ductus arterioso, o de una vena cava superior izquierda persistente (265, 294).

En los casos donde se evidencian grandes arterias colaterales que se originan de la aorta, estas se han reportado pueden ser responsables de un shunt izquierda-derecha y ser causa del inicio temprano de una enfermedad hipertensiva pulmonar vascular (264, 265, 294). También se evidencia en algunos de los pacientes la presencia de una válvula pulmonar afectada de manera aislada presentándose imperforada, en vez de estenótica (265).

Otra de las variantes, presentes en un vigésimo de aquellos afectados por TOF, es la ausencia de válvula pulmonar. El mal alineamiento del tabique de salida, con formación rudimentaria de valvas de la válvula pulmonar, organizadas de manera circular en la unión ventrículo-pulmonar, causando regurgitación pulmonar a lo largo de la vida fetal. Este evento produce que la carga crónica del ventrículo derecho sea transmitida a las arterias pulmonares, produciendo la dilatación concomitante de estos vasos. En la mayoría de los casos este cuadro se presenta con ausencia del ductus arterioso (265,297, 298).

Otros hallazgos descritos incluyen: defectos del septum AV , evidenciado en 13% de los pacientes con TOF (264,299-301); foramen oval persistente o defecto del septum atrial tipo ostium secundum, al igual que otros defectos septales

musculares como el defecto septal interatrial reportado por Fallot (264,261); anomalías de las válvula mitral que incluyen hendidura de la valva anterior, doble orificio mitral, o válvula mitral en paracaídas; valvas tricúspides cabalgadas o sobrepuestas; tejido accesorio atrioventricular, asociado a la presencia de un colgajo fibroso remanente del septum membranoso o tejido accesorio asociado a la válvula tricúspide (264, 302, 303); Ductus arterioso persistente o ausente, este último generalmente asociado a la ausencia de la válvula pulmonar (264, 304-306); arco aórtico con ramificaciones en espejo de las arterias braquiocefálicas, alteración generalmente asociada con anomalías morfológicas de la arteria subclavia y que se evidencia en 50% de los pacientes con TOF (307, 308); dilatación de la raíz aortica, evidenciada en pacientes con y sin corrección quirúrgica; estenosis de las arterias pulmonares; y ventrículo derecho bicameral, originado por la hipertrofia de la porción apical de la trabécula del septomarginalis o de la banda moderadora (Ver tabla 1.) (264, 309).

TOF puede asociarse con otras anomalías extracardíacas, las cuales en pueden asociarse a diferentes síndromes genéticos u otras alteraciones génicas, las cuales serán abordadas a profundidad en la siguiente sección sobre las causas etiológicas de la Tetralogía de Fallot.

**Tabla 1.** Anomalías cardiovasculares asociadas a tetralogía de Fallot.

<b>Anomalía asociada</b>
Defecto del septum atrial
Defecto del septum atrioventricular
Defecto del septum ventricular de salida perimembranoso
Defecto del septum ventricular de entrada perimembranoso
Defecto del septum ventricular de salida muscular
Defecto del septum ventricular muscular trabecular
Defecto del septum ventricular subarterial
Vena cava superior persistente izquierda
Seno coronario ausente
Doble orificio válvula tricúspide
Tejido accesorio atrioventricular
Doble orificio válvula mitral
Hendidura válvula mitral
Válvula mitral en paracaídas
Válvula pulmonar unicúspide
Válvula pulmonar bicúspide
Atresia de la válvula pulmonar
Rama pulmonar izquierda ausente
Lazo de la arteria pulmonar
Válvula aórtica bicúspide
Prolapso válvula aórtica
Anomalías de las coronarias
Arco aórtico derecho
Doble arco aórtico
Ramificación en espejo del arco aórtico
Anillo vascular
Arteria subclavia derecha retro-esofágica
Ductus arterioso ausente/persistente
Colaterales sistémicas hacia arterias pulmonares
Dilatación arteria pulmonar

### **3.15. Causas etiológicas de la tetralogía de Fallot**

Las CHD se consideran de etiología multifactorial, incluyendo la TOF, sin embargo, diferentes alteraciones genéticas han sido estrechamente asociadas como causal de este tipo de alteraciones cardíacas. Esto ha sido demostrado mediante diferentes estudios clínicos, epidemiológicos, embriológicos y moleculares. Las Malformaciones extracardíacas en el contexto de síndromes cromosómicos y monogénicos se evidencian en 25-35% de los pacientes con TOF (310-313). Las anomalías cromosómicas se asocian en 12% de los casos, síndromes monogénicos y asociaciones no mendelianas en un 7%, y anomalías múltiples no clasificadas en un 13% (310, 311).

Diferentes genes causantes de TOF han sido identificados en diferentes síndromes, y en algunos casos no sindrómicos (314, 315). La correlación entre los patrones anatómicos cardíacos y algunas anomalías genéticas sugieren que los mecanismos específicos morfogenéticos puestos en movimiento pueden dar lugar a fenotipos cardíacos específicos (310, 316).

De igual manera diferentes factores ambientales han sido asociados con aumento de riesgo para el desarrollo de diferentes CHD, incluyendo TOF. Entre estos se incluyen diferentes condiciones maternas presentes durante el embarazo como lo es la diabetes pregestacional, que aumenta el riesgo de CHD de 3.1 -18 veces;



fenilcetonuria no tratada que aumenta el riesgo más de 6 veces; enfermedades febriles, de 1.8 a 2.9 veces (317); factores externos medioambientales, como la exposición a solventes orgánicos (311), o dióxido de carbono durante las primeras semanas de embarazo (30).

En los siguientes segmentos se abordará a profundidad cada uno de estos escenarios etiológicos, desde las alteraciones cromosómicas, pasando por las diferentes variantes monogénicas sindrómicas y no sindrómicas descritas, hasta la influencia ambiental en la aparición de TOF.

### **3.16. Cromosomopatías asociadas a tetralogía de Fallot**

#### **3.16.1 Trisomías**

Las aneuploidias cromosómicas son la primera causa genética reconocida de CHD, y aunque casi cualquier tipo de anomalía cardíaca puede ocurrir en el contexto de una aneuploidía cromosómica, algunas lesiones prototípicas son descritas en síndromes frecuentes como AVSD en la trisomía 21, coartación de aorta (CoA) en el síndrome de Turner, mientras que otras se encuentran poco representadas. Esto sugiere de las observaciones genotipo-fenotipo que las malformaciones cardíacas no se deben al cambio global del contenido génico, sino de la dosis alterada de genes específicos (4).

En el caso de TOF, este se encuentra asociado con una gran variedad de alteraciones cromosómicas, aproximadamente 32% de los casos de TOF ocurren como parte de la expresión fenotípica de un síndrome que exhibe fenotipos extracardíacos (313). De estos, los más frecuentemente asociados son la trisomía 13 (síndrome de Patau), trisomía 18 (síndrome de Edwards) y la trisomía 21 (síndrome de Down) (319-321). Las CHD se encuentran presentes en 80% de los casos con trisomía 13, y en 90% de aquellos con trisomía 18 (4, 313).

La trisomía 21 (síndrome de Down) es la alteración cromosómica más frecuente en los humanos, con una incidencia de 1/680 recién nacidos vivos que aumenta

progresivamente con la edad materna, llegando a incidencias de 1/30 recién nacidos vivos en madres de 45 años de edad o más (322, 323). El riesgo de recurrencia es del 1% en la población general (324) y es la causa genética más común de retraso mental en todo el mundo (325).

La trisomía 21 se asocia con la presencia de múltiples anomalías extracardíacas que incluyen: Baja talla, braquicefalia, fisuras palpebrales inclinadas hacia arriba, pliegues epicánticos, lengua protruida, estenosis duodenal, ano imperforado, enfermedad de hirschsprung, hipotonía, pliegue palmar único, déficit cognitivo, hipotiroidismo (326). Sin embargo, uno de los hallazgos más destacados es la presencia de CHD que afectan al 40-60% de los niños con síndrome de Down y son consideradas el factor determinante en la evolución de los pacientes con trisomía 21 y el mayor factor de riesgo de morbilidad en los 2 primeros años de vida (327).

Los defectos del canal atrioventricular (AVCD) son la CHD más frecuente en la trisomía 21, mientras que la TOF es la única cardiopatía conotruncal descrita presente en 8% de los pacientes afectados (310, 321, 328). Entre los hallazgos morfológicos distintivos de la TOF en pacientes con síndrome de Down se describe la presencia de VSD particularmente grande, estenosis de la subpulmonar que generalmente no es severa, y arterias pulmonares de adecuado calibre.

Adicionalmente, las anomalías cardíacas asociadas a la TOF en esta alteración cromosómica es AVCD completo tipo C de Rastelli, en donde La inserción de las valvas anterosuperiores izquierdas, también conocida como valva puente, y la valva derecha se insertan en un músculo papilar de la pared libre del ventrículo derecho y esta valva puente se ubica por encima de la comunicación interventricular; y en algunas ocasiones ventrículo derecho hipoplásico (310, 328, 329).

Los estudios realizados en Colombia donde se caracterizan las CHD presentes en pacientes con síndrome de Down son escasos, sin embargo se resaltan dos publicaciones, la primera realizada por Gamarra y colaboradores en el año 2013, quienes estudiaron el comportamiento de las CHD asociadas al Síndrome de Down en la población de un centro terapéutico especializado de la ciudad de Bogotá, mediante el desarrollo de un estudio descriptivo transversal con registros clínicos de 157 pacientes con diagnóstico cariotípico de Síndrome de Down. Los resultados de este estudio evidenciaron la presencia de CHD en el 65.8% de los pacientes, de los cuales 33,7% presentaban CHD con defectos aislados. El defecto cardíaco más reportado fue el ductus arterioso persistente, seguido de la comunicación interauricular y la comunicación interventricular. El defecto múltiple más recurrente evidenciado fue la comunicación interauricular asociada a comunicación interventricular con un 18,4% de los casos (330).

Posteriormente, Gallo y colaboradores publicaron en el 2015 un estudio observacional de tipo descriptivo retrospectivo en el que se evaluaron las historias clínicas de los niños con diagnóstico de trisomía 21, que asistían a la consulta de cardiología pediátrica o que nacieron en alguna de las cuatro instituciones participantes de la ciudad de Bogotá (Hospital la Misericordia, Clínica la Mujer, Centro Policlínico de Olaya y Clínica Candelaria), durante el período comprendido entre enero del 2011 a diciembre del 2014. En este estudio se obtuvo información de 527 pacientes de los cuales el 60.3% presentaban una CHD. Los defectos cardíacos más recurrentes identificados fueron el ductus arterioso persistente en el 27.3%, la Comunicación interauricular en el 21.3%, Comunicación interventricular en el 19.7%. En el caso de la Tetralogía de Fallot solo fueron reportados tres casos de los 527 evaluados (327).

### **3.16.2 Deleciones y duplicaciones**

Otro grupo de desequilibrios cromosómicos estrechamente asociados con la presencia de TOF, son aquellos síndromes que se encuentran asociados a cromosomopatías estructurales que producen variantes de copia numérica, específicamente deleciones y duplicaciones. Dentro de este grupo de alteraciones encontramos síndrome por deleción 8p23, condición en donde dos tercios de los afectados presentan TOF, esto posiblemente causado por su efecto sobre el gen GATA4, el cual se encuentra en el locus 8p23.1, y como fue explicado previamente, se expresa en el corazón en desarrollo (331,332). Sin embargo, con

los adelantos en las técnicas moleculares y citogenéticas, nuevos síndromes causados por anomalías submicroscópicas han sido identificados, entre estos la más frecuente es el síndrome por delección 22q11.2, que produce un espectro de fenotipos que varía desde el síndrome de DiGeorge (MIM 188400) hasta el síndrome de velocardiofacial (MIM: 192430). Este síndrome tiene una prevalencia aproximada de 1 en 4000 recién nacidos vivos (RNV), y CHD se evidencian en 75% de los pacientes afectados (333, 334).

El síndrome de DiGeorge se caracteriza por un fenotipo que incluye: baja talla, micrognatia, orejas de implantación baja, déficit auditivo, tortuosidad de la vasculatura de la retina, hipertelorismo, fisuras palpebrales cortas, ambliopía, estrabismo, esclerocornea, filtrum corto, paladar alto y/o hendido, úvula bífida; cardiopatía congénita que incluye tetralogía de Fallot, tronco arterioso, arco aórtico interrumpido, arco aórtico derecho, defectos del septum ventricular, y ductus arterioso persistente. Otros hallazgos descritos son hernia umbilical, hernia inguinal, escoliosis, retardo del desarrollo psicomotor, dificultad para el aprendizaje y el desarrollo del lenguaje, convulsiones, hipoplasia o ausencia de tiroides, hipoplasia o ausencia de timo, déficit de células T, susceptibilidad a infecciones, e hipocalcemia (335).

El síndrome velocardiofacial exhibe en su espectro fenotípico baja talla, microcefalia, cara larga, síndrome de Pierre Robin, retrognatia, anomalías

auriculares menores, fisuras palpebrales estrechas, discos ópticos pequeños, vasos de la retina tortuosos, embriotoxon posterior, tejido linfoide nasofaríngeo disminuido, nariz tubular, alas nasales hipoplásica, punta nasal bulbosa, paladar hendido, insuficiencia velofaríngea, hipotonía faríngea; alteraciones vasculares y cardiopatías congénitas, presentes en el 85% de los casos, que incluyen defectos del septum ventricular, tetralogía de Fallot, arco aórtico derecho, subclavia izquierda aberrante, anomalías de la arteria carótida interna. Otros hallazgos incluyen disgenesia pulmonar primaria, hernia inguinal y umbilical, déficit cognitivo, dificultades de aprendizaje, voz nasal, y manifestaciones psiquiátricas (336).

Los síndromes por delección 22q11.2 son causados generalmente por una delección de 1.5-3 megabases en el locus 22q11.2, que abarca aproximadamente 30-40 genes. Entre los genes enmarcados en esta región se incluye el gen TBX1, gen que ha sido asociado en múltiples estudios animales con las anomalías vasculares y cardíacas, y se cree es el mayor contribuyente al fenotipo cardíaco expresado en delección 22q11.2 (337).

Es importante resaltar que a pesar de que un porcentaje importante de pacientes con delección 22q11 presentan en su cuadro clínico TOF, solamente un 10% de los pacientes presentan TOF clásico (312, 338 339), y un 35% de pacientes con TOF asociada a atresia pulmonar y defecto del septo ventricular (313), presentan una delección 22q11.2 (310, 312, 338, 339).

Los pacientes con TOF y síndrome por delección 22q11.2 frecuentemente presentan otras CHD entre las cuales se incluyen: 1. arco aórtico derecho o cervical con o sin arteria subclavia izquierda aberrante, 2. ausencia o hipoplasia del septum infundíbular, 3. Ausencia de válvula pulmonar, 4. Discontinuidad o hipoplasia difusa de las arterias pulmonares (312, 338, 340). En el caso de TOF con atresia pulmonar, la presencia de arterias colaterales aorto-pulmonares, en ocasiones asociadas a discontinuidad de las arterias pulmonares, son frecuentes en estos pacientes con prevalencia de 35-40% de delecciones 22q11.2 (313, 341, 342); Caso opuesto a cuando se presenta atresia pulmonar con defecto del septum ventricular con circulación pulmonar dependiente del ductus arterioso y arterias pulmonares confluentes, en donde la frecuencia de delección 22q11.2 es de aproximadamente el 10% (310).

En Colombia, Salazar y colaboradores analizaron a 61 pacientes atendidos durante los años 2008 y 2009, con diagnóstico clínico de CHD no sindrómicas, con fenotipo normal. De los pacientes analizados 3 presentaron microdelección 22q11.2, de los cuales dos tenía diagnóstico de TOF, y uno presentaba un defecto septal atrial. Este estudio concluye que La frecuencia de la microdelección dentro de la población analizada fue del 4,9%. Los casos que presentaban TOF tenían una frecuencia de la microdelección de 7.4% y para ASD del 11.1% (343).



### **3.17. Alteraciones monogénicas asociadas a tetralogía de Fallot**

Otro mecanismo patológico asociados a la presencia de TOF, es aquel relacionado con la presencia de mutaciones puntuales o pequeñas inserciones/deleciones en donde un gen específico se encuentra afectado. Estas alteraciones monogénicas las podemos clasificar dentro de dos grupos acorde a su expresión fenotípica en aquellos afectados.

El primer grupo es aquel compuesto por síndromes y asociaciones en donde tenemos un espectro clínico fenotípico claramente definido, que se encuentra asociado a la alteración de un gen específico (Ver tabla 2.). Este es el caso del síndrome de Alagille, patología hepato-cardíaca en aproximadamente el 90% de los afectados presentan CHD, siendo la más frecuente la estenosis periférica pulmonar y la TOF la más frecuente de las malformaciones cardíacas complejas. Sin embargo, clásicamente esta se describe un patrón cardiovascular específico que consiste en la asociación de TOF con estenosis múltiple de arterias pulmonares periféricas (310, 344).

El gen JAG1, ligando de la vía Notch, es el gen descrito como responsable de más del 90% de los casos de síndrome de Alagille; este gen ha sido correlacionado con el fenotipo cardiovascular en diferentes estudios realizados en corazones de embriones humanos y murinos, donde se ha evidenciado la prevalencia en la

expresión de este gen a nivel arterial (345). Otro gen asociado es NOTCH 2 el cuál ha sido identificado en grupos familiares con síndrome de Alagille, y es responsable del 1-2% de los casos (310, 346). El 50%-70% de las mutaciones presentes en el síndrome de Alagille se producen de novo, y más del 80% de estas mutaciones generan proteínas truncadas (mutaciones sin sentido/nonsense, cambio del marco de lectura, cambios en el sitio de splicing), 7% se asocian a delección del gen y el resto se asocian a mutaciones con pérdida de sentido/missense (347, 348).

Es llamativo en el caso de las mutaciones con pérdida de sentido/missense, estudios como los realizados por Fengmin Lu y colaboradores, en donde identificaron una mutación en JAG1 que co-segrega con CHD en ausencia de enfermedad hepática. Este efecto lleva a los autores a sugerir que el corazón es mucho más sensible a las alteraciones en dosis de JAG1, en comparación al hígado (349).

Recientemente también se ha descrito en el caso de NOTCH2 mutaciones que causan el síndrome de Hajdu-Cheney, patología de carácter autosómico dominante que causa destrucción focal ósea, osteoporosis, anomalías faciales, quistes renales, paladar hendido y CHD (350). Estas mutaciones se predice que alteran el dominio intracelular PEST (rico en glutamato-serina-prolina-treonina) disminuyendo el despeje del dominio intracelular de Notch (350-352). Esto sugiere la relación

compleja entre genotipo y fenotipo, en donde mutaciones diferentes en un mismo gen pueden causar síndromes monogénicos diferentes.

Otra patología contenida en este grupo es el síndrome de CHARGE (Coloboma ocular, defecto cardiaco, atresia de coanas, retardo del crecimiento y del desarrollo, hipoplasia genital y anomalías en el oído). En este síndrome se ha reportado que 84% de los pacientes presentan CHD, y la asociación entre TOF y defecto del canal atrioventricular es frecuentemente descrita (353). En la mayoría de pacientes la causa etiológica son mutaciones en el gen CHD7, gen miembro de la familia helicasa con cromodominio de unión a ADN de modificadores de cromatina dependientes de ATP (310, 354, 355).

El segundo grupo está conformado por aquellos casos de TOF no sindrómica, en donde el análisis molecular de largas series de pacientes ha llevado a la identificación de un número genes asociados a la presencia del fenotipo cardiaco. Este grupo se considera que es genéticamente heterogéneo, y el número de genes identificados es escaso, por lo que se considera que la detección de cada defecto monogénicos es posible solo en algunos casos, y los genes identificados sugieren un rol importante en el desarrollo de factores de transcripción de la cardiogénesis (Ver tabla 3 y 4.) (310, 314, 340, 356).

Entre los genes identificados se incluye NKX2.5, previamente se describe su rol en la cardiogénesis en este manuscrito, el cual se expresa en el mesodermo cardiaco durante fases tempranas de la cardiogénesis y cuya mutación en modelos murinos ha sido asociada con falla en el desarrollo cardiaco durante la fase de desarrollo del corazón linear. Las mutaciones en este gen han sido detectadas en 1-4% de los casos de TOF no sindrómica (310, 314, 340, 356).

Otros genes descritos son FOG2, considerado como mediador de GATA4 durante la cardiogénesis y evidenciado alterado en 4% pacientes con TOF aislada (356); CITED2 detectado en 6% de los afectados y asociado a muerte in-útero en modelos murinos (357); JAG1, gen estrechamente asociado al síndrome de Alagille, ha sido detectado en 3% de los casos de TOF no sindrómica (315, 348). También se han documentado casos asociados a otras mutaciones en genes de la vía NODAL y algunas variantes raras de TBX1 (314, 358, 359).

En estudios recientes nuevas variantes de los genes FOXC1, HAND2, FOXA2, y GJA5 han sido reportados en individuos con TOF, sin embargo, es importante considerar que en algunos de estos casos las variantes genéticas evidenciadas en los probandos fueron identificadas también en padres no afectados, lo que hace considerar que estos casos ocurren por la sumatoria de diferentes factores de susceptibilidad y no por una causa única (360, 361). Estudios similares han identificado diferentes CNV, o ganancias o pérdidas de ADN contiguo que varían de

tamaños de 1 kb a varios Mbs (362), en casos esporádicos de Fallot, que corresponden a diferentes loci relacionados con genes ya asociados con esta anomalía, como nuevas regiones críticas que posiblemente correspondan a nuevos genes relacionados con CHD (314,363-365). Estudios realizados por Greenway y colaboradores, predice que aproximadamente un 10% de pacientes con TOF no sindrómica puede ser causada por CNV de novo, lo que sugiere que mutaciones en genes localizados en estos loci pueden ser la causa etiológica de otros casos de TOF (310,363).

Las CNV son detectadas generalmente usando microarrays de polimorfismos de un solo nucleótido o hibridación genómica comparativa. Diferentes retos se presentan al diferenciar CNV patogénicas de aquellas benignas polimórficas, lo que demuestra la importancia de las CNV patogénicas en CHD (366). Sin embargo, los estudios publicados a la fecha tienden a enfocarse en subpoblaciones particulares de individuos con CHD, clasificados generalmente por su anatomía cardíaca. Ciertas CNV se presentan de manera recurrente y con mayor frecuencia en individuos con CHD, algunas de las cuales también se asocian con anomalías extracardíacas (367-369).

El rol de las CNV en TOF ha sido estudiado en dos grandes investigaciones. El primero por Greenway y colaboradores en el 2009, en donde el 10% de 114 pacientes con TOF se detectaron como portadores de raras CNV de novo,

posteriormente aproximadamente 400 probandos con TOF fueron evaluados por CNV en nueve loci obteniendo hallazgos positivos en el 5% de ellos, evidenciando varias CNV recurrentes con pérdida y ganancia en el locus 1q21.1 (1% de los casos) (363).

El segundo estudio fue realizado por Silversides y colaboradores en el 2012, en donde a más de 400 adultos con TOF con o sin atresia pulmonar, pero sin anomalías genéticas conocidas, como delección 22q11; evidenciando que CNV largas (500kbs) y raras eran más frecuentes en los casos en comparación a los controles (8.8% vs. 4.3%) presentando en la mayoría de los casos ganancias génicas. En los casos en donde las CNV contenían genes, los sujetos eran más propensos a exhibir anomalías extracardíacas. Entre las CNV identificadas varias han sido implicadas previamente como patológicas, como es el caso de duplicaciones 1q21.1 (observada en 1.2% de pacientes con CHD), duplicación 16p11.2, y duplicación 22q11.21 (369, 370).

Finalmente, a pesar de que en la literatura se describen diferentes grupos clasificados por causa etiológica genética, existe una proporción importante de pacientes con TOF, en asociación a otras malformaciones, que exhiben un patrón clínico claro sin una causa etiológica conocida, como es el caso de la asociación VACTERL (anomalías vertebrales, atresia anal, defecto cardíaco, fistula traqueo-esofágica/ atresia esofágica, anomalías renales, y malformaciones de las

extremidades), y el espectro óculo-aurículo-vertebral (microtia, microsomia hemifacial, hipoplasia de la mandíbula, quiste dermoide corneal, y malformaciones en las vértebras cervicales) (310, 371, 372). Estos casos aportan a la noción de heterogeneidad etiológica que presenta la TOF, por lo que el desarrollo de estudios centrados en este tipo de patologías podría revelar nuevas vías moleculares asociadas al desarrollo cardíaco.

**Tabla 2.** Caracterización clínica y cardíaca de síndromes asociados a tetralogía de Fallot.

Síndrome	Código OMIM	Defecto Genético	Fenotipo extracardíaco	Subtipo de Tetralogía de Fallot	Cardiopatías Adicionales
Síndrome de Patau	-	Trisomía 13	Hendidura orofacial	-	-
			Microftalmia		
			Aplasia cutis		
			Polidactilia		
			Baja Talla		
			Déficit cognitivo		
Síndrome de Edwards	-	Trisomía 18	Anomalías faciales	-	Displasia polivalvular
			Anomalías de las manos		
			Anomalías cerebrales		
			Malformaciones renales		
			Baja Talla		
			Déficit cognitivo		
Síndrome de Down	609892	Trisomía 21	Anomalías faciales	Defectos del septum ventricular	Defecto canal atrioventricular
			Estenosis duodenal	Arterías pulmonares de buen tamaño	Ventrículo derecho hipoplásico
			Enfermedad de Hirschprung		
			Hipotonía		
			Déficit cognitivo		
Deleción 8p23	-	Deleción 8p23	Anomalías faciales	-	Defecto canal atrioventricular
			Microcefalia		
			Hipospadias		
			Déficit cognitivo		
Síndrome de Digeorge	188400	Deleción 22q11	Anomalías faciales	Hipoplasia septum infundíbular	Anomalías del arco aórtico

			Anomalías palatinas		Arteria subclavia izquierda aberrante
			Hipocalcemia neonatal		Ausencia de válvula pulmonar
			Inmunodeficiencia		Hipoplasia de las arterias pulmonares
			Alteraciones del lenguaje		Grandes arterias colaterales aortopulmonares
Síndrome Velocardiofacial	192430		Problemas del aprendizaje	Atresia pulmonar	
Síndrome de Alagille	118450	Mutación gen JAG1	Colestasis crónica	-	Estenosis múltiple de las arterias periféricas pulmonares
			Escasez de conductos biliares interloburales		
		Mutación gen Notch2	Anomalías esqueléticas		
			Embriotoxon ocular		
Síndrome de CHARGE	214800	Mutaciones gen CHD7	Anomalías faciales	-	Anomalías del arco aórtico
			Coloboma ocular		
			Atresia de coanas		
			Anomalías de las orejas		
Asociación VACTERL	192350	Desconocido	Sordera	-	Defecto canal atrioventricular
			Anomalías urogenitales		
			Retardo del crecimiento		
Espectro Óculo-Auriculo-Vertebral (Síndrome de Goldenhar)	164210	Desconocido	Defectos vertebrales	-	Anomalías del retorno venoso pulmonar
			Atresia anal		
			Atresia esofágica		
			Anomalías renales		
			Malformaciones de las extremidades		
			Microtia		
			Microsomia hemifacial		
			Hipoplasia mandibular		
			Dermoides epibulbares		
			Malformaciones cervicales		

Modificado de Digilio MC, Dallapiccola B, Marino B; Genetics, In: Chessa M., Giamberti A., The Right Ventricle in Adults with Tetralogy of Fallot (310).



**Tabla 3.** Genes asociados a tetralogía de Fallot no sindrómica.

Genes	Pacientes con mutaciones/ Pacientes analizados	%	Referencias
NKX2.5	6/150	4%	Goldmuntz et al. (340)
	9/201	4,50%	McElhinney et al. (373)
	2/194	1%	Rauch et al. (314)
FOG2	2/47	4%	Pizzuti et al. (356)
CITED2	3/46	6%	Sperling et al. (357)
NODAL	15/121	12%	Roessler et al. (358)
JAG1	3/94	3%	Bauer et al. (348)
	3/112	2,70%	Guida et al. (315)
TBX1	3/93	3%	Griffin et al. (359)
	2/191	1%	Rauch et al. (314)
FOXA2	4/93	4%	Topf et al. (360)
GJA5	2/178	1%	Guida et al. (361)
FOXC1	1/93	1%	Topf et al. (360)
HAND2	1/93	1%	Topf et al. (360)

Original tomado de Digilio MC, Dallapiccola B, Marino B; Genetics, In: Chessa M., Giamberti A., The Right Ventricle in Adults with Tetralogy of Fallot (310).

**Tabla 4.** Genes OMIM asociados a Tetralogía de Fallot.

Locus	Gen	Código OMIM
5q35.1	NKX2-5	600584
8p23.1	GATA4	600576
8q23.1	ZFPM2	603693
18q11.2	GATA6	601656
19p13.11	GDF1	602880
20p12.2	JAG1	601920
22q11.21	TBX1	602054

### **3.18. Factores epigenéticos asociadas a tetralogía de Fallot**

Durante el proceso de la cardiogénesis en mamíferos, la especificación del linaje celular cardíaco se logra mediante la acción de diferentes factores de transcripción y su control meticuloso a nivel epigenético. El desarrollo del corazón durante el periodo embrionario y especificación posterior depende de la activación precisa de un programa génico que implica enzimas que controlan el remodelamiento del nucleosoma, modificación de histonas, y metilación de ADN (355). Errores en la apropiada dirección de estos mecanismos puede resultar en la aparición de fenotipos deletéreos en donde se incluyen CHD, o letalidad durante la embriogénesis (355, 374, 375)

Aunque la información epidemiológica indica que los factores medioambientales juegan un rol importante en la etiología de TOF, la influencia epigenética debe ser considerada para lograr comprender los mecanismos que llevan a que las interacciones genes-ambiente produzcan procesos patológicos (7, 376). Actualmente el mecanismo de modificación epigenética en humanos más ampliamente estudiado es la metilación de ADN, que ocurre casi de manera exclusiva en el contexto de dinucleótidos CpG que controlan la actividad transcripcional de los genes (377). La metilación desacetada de ADN puede resultar en silenciamiento de la expresión génica e inactivación funcional, proceso que ha sido evidenciado en varias patologías

como glioblastoma, leucemia linfocítica crónica, cáncer invasivo cervical (378-382). En el escenario de las CHD se han realizado diferentes estudios en los últimos años buscando revelar el efecto de los mecanismos epigenéticos en la aparición de este tipo de patología (382).

El folato es la vitamina B hallada de forma natural en varios alimentos, es la encargada de suplir el grupo metilo para las reacciones de metilación en la célula, incluyendo la metilación de ADN. Diferentes estudios realizados en grupos poblacionales diferentes han evidenciado que la suplementación nutricional de folato reduce el riesgo de CHD, mientras que el consumo de agentes anti-folato se asocian con aumento de riesgo (383- 385). El folato y su metabolito asociado homocisteína, se cree son críticos para la migración de las células de la cresta neural desde su origen en la región craneal hasta su destino final en la región torácica, en donde su participación es crítica en el desarrollo de los grandes vasos, tractos de salida y otras regiones cardiacas (386).

Bahado-Singh y colaboradores en el 2012 reportaron diferencias significativas en los niveles de ácido fólico sanguínea en recién nacidos con síndrome de corazón izquierdo hipoplásico (387), posteriormente mediante un estudio de casos y controles evaluaron las diferencias en la metilación de ADN en diferentes tipos de CHD, con el propósito de elucidar posibles mecanismos de CHD mediante análisis de vías de los datos de metilación, encontrando diferencias significativas en los niveles de

metilación de citosina en múltiples genes para diferentes categorías de CHD; y en el caso específico de TOF mediante análisis utilizando *Gene Ontology* evidenciando un posible rol crucial de los genes asociados a la adhesión celular en la patogénesis de esta anomalía (385).

Otro de los elementos génicos estudiados son los elementos nucleares dispersos largos – 1 (LINE-1), elementos repetitivos que constituyen el 17-25% del genoma y son moderadamente ricos en CpG, y la mayoría de los CpGs altamente metilados se localizan en el extremo 5' de las regiones no traducidas (UTR), donde sirven como promotores internos (388, 389). Debido a que las secuencias LINE-1 son retroposones humanos que se encuentran frecuentemente repetidos y ampliamente interespaciados, su nivel de metilación puede servir como un marcador de metilación global de ADN (390). Hipometilación en la región promotora de LINE-1 produce la activación de elementos LINE-1 que causan la transposición del retroelemento y alteraciones cromosómicas (391). Alteraciones del estatus de metilación de LINE-1 han sido observadas frecuentemente en patologías como cáncer de colon, defectos del tubo neural, lupus eritematoso sistémico; en el caso de CHD hipometilación de ADN LINE-1 materna se asociado con la presencia de CHD no sindrómicas (390, 392- 396)

En diferentes estudios se ha evidenciado que los pacientes con TOF presentan niveles significativamente elevados de metilación en las islas CpG de promotores de los genes NKX2.5 y HAND1, y en el caso del gen TBX20 se evidencia niveles bajos

de metilación en la misma región; hallazgos que han sido consistentes con otros estudios de expresión de ARNm, sin embargo una correlación directa entre los niveles de metilación de NKX2.5, HAND1, y TBX20; y cambios en los niveles de expresión de ARNm no han sido establecidas (397). Niveles de metilación del gen GATA 4 también han sido estudiados sin embargo no se han evidenciado diferencias significativas entre individuos afectados y sujetos de control (382).

En los casos de TOF sindromático también se ha evidenciado el rol de diferentes mediadores epigenéticos, En el caso del síndrome de CHARGE, análisis ChIP-chip (Inmunoprecipitación de cromatina y ADN microarray) del gen CHD7 muestra que CHD7 se une a sus sitios diana en un tipo específico celular y se asocia a las tres formas metiladas de la histona H3K4, sin embargo, se une con mayor fuerza con los sitios mono-metilados (H3K4me1) y di-metilados (H3K4me2) (398). Los sitios de unión de CHD7 se localizan alejados de los sitios de inicio transcripcional y sobrelapan con sitios de hipersensibilidad DNasa I, indicando que CHD7 podría unirse y regular regiones enhancer o elementos aislantes para el depósito de marcas epigenéticas que definen especificación de linaje (398, 399).

Genes inactivos que están marcados por H3K4 mono-metildos y dimetilados enfrentan una ronda de acetilación y de-acetilación excluyendo así la unión de la Polimerasa II para la transcripción de genes, sin embargo, estos genes son mantenidos en un estado suspendido para su activación futura. Se cree que CHD7

recluta la unión de otras enzimas modificadoras de histonas para mediar la metilación de histonas y la acetilación/ deacetilación para afectar la maquinaria transcripcional (400). A pesar de que actualmente no hay estudios que vinculen directamente la asociación de CHD7 a metilado H3K4 y a la expresión aberrante de genes cardíacos; haploinsuficiencia de CHD7 en ratones causa hipoplasia de la arteria del arco faríngeo, fenotipo observado en ratones TBX1 heterocigotos (401).

En el caso del síndrome de DiGeorge, El rol de TBX1 ha sido ampliamente estudiado, siendo consistente en su función de promover la transcripción de FGF10 en el SHF. En el caso de su delección se produce la pérdida de proliferación celular en el SHF (402- 405). La regulación de la expresión génica cardíaca por TBX1 requiere de interacción cooperativa con NKX2.5 para regular el enhancer Pitx2, adicionalmente, existe una interacción física y funcional entre TBX1 y ASH2L, siendo este último un componente central de una subunidad de metiltransferasa de histona multimérica que es responsable de regular epigenéticamente la transcripción al metilar las colas N-terminal de las histonas, y co-activar genes diana de TBX1 (355, 404, 405).

En la última década sobresalen en la literatura el número de estudios sobre ARN no codificantes, brindando una nueva visión a los mecanismos subyacentes de diferentes condiciones patológicas congénitas. Los miRs, pequeñas moléculas de ARN no codificante, conservadas evolutivamente, que regulan de manera negativa la

expresión génica (245). Se estima que los miRs tienen el potencial de regular 30% de los genes humanos mediante una serie de complejas vías de señalización (406). Pueden asimismo coordinadamente regular la estabilidad de múltiples genes blanco, y su expresión anormal puede afectar múltiples vías de señalización intracelular causando varias patologías como cáncer, diabetes, y CHD (407-409). Los miRs han sido establecidos como componentes importantes del desarrollo embrionario, incluyendo la cardiogénesis, función normal cardiovascular, y patofisiología de varios linajes celulares (410-415).

Su función reguladora se basa en seleccionar ARNm para clivaje o represión translacional, causando la disminución de estos (245). Similar a los genes codificantes de proteínas, los miRs tienen un origen genómico (416) y su disregulación puede causar diferentes anomalías funcionales y estructurales cardíacas en el adulto o en el infante produciendo un espectro de alteraciones de las cuales algunas pueden ser potencialmente fatales como arritmias, cardiomiopatías, falla cardíaca, y muerte súbita (2,417-419).

Recientemente se ha investigado el rol de miRs en la etiología de las CHD cianosantes, O'Brien y colaboradores identificaron la asociación entre TOF no sindrómica con miRs y espliceosomas ARN (415, 420). Este estudio identificó 61 miRs que presentaban cambios significativos en los niveles de expresión de niños con TOF, en contraste a los controles. Es importante resaltar de este estudio que los

niveles de expresión de miR en aquellos con TOF son similares a los expresados en el miocardio fetal; también que los casos estudiados presentaban variantes de splicing en el 51% de los genes críticos para el desarrollo cardíaco. 33 miRs fueron identificados que presentaban disminución en su regulación en el tejido miocárdico en TOF comparado al miocardio normal sugiriendo el rol central de los miRs y su función de espliceosoma en TOF (415, 420). Este grupo posteriormente identificó la correlación inversa entre la expresión de miR-421 y SOX4 en pacientes con TOF, siendo este último un regulador clave de la vía Notch, lo que sugiere el rol de miR-421 en TOF (415, 421).

Bittel y colaboradores analizaron el rol de miR-421, el cual se encuentra aumentado en el tejido del ventrículo derecho de infantes con TOF (420), evidenciando que la sobreexpresión de miR-421 en cardiomiocitos normales inhibía SOX4, mientras que en células primarias de pacientes TOF con miR-421 inactivado presentaban aumento en la expresión de SOX4 (420), apoyando la hipótesis de una correlación inversa entre miR-421 y SOX4 (422, 423). Sin embargo, miR-421 presenta múltiples objetivos, por lo que la posible correlación directa entre este miR y los cambios de expresión de SOX4, y su impacto en las vías Notch y Wnt está pendiente a ser evaluada (421).

Otros miRs estudiados incluyen miR-940, este parece ser el miRs con mayor expresión en el tracto de salida ventricular derecho humano normal, sin embargo, se



encuentra sustancialmente disminuido en pacientes TOF (424). miR-1 y miR-206 han sido descritos entre los posibles miRs asociados en disminuir la expresión de la conexina 43, sugiriendo su posible rol en TOF (425, 426). Recientemente estudios de microarray en biopsias del tracto de salida ventricular de pacientes TOF y controles identificaron 41 miRs candidatos, de los cuales 18 se expresan de manera diferenciada en el tracto de salida ventricular derecho de pacientes con TOF no-sindrómico. Estos miRs tienen como objetivo una red de genes asociados a la cardiogénesis y CHD. Subsecuente datos in-vitro confirman que la sobreexpresión de miR-424/424\* aumentó la proliferación e inhibió la migración de cardiomiocitos embrionarios de ratón mediante la supresión de HAS1 y NF1, genes que se reportaron inhibidos en las muestras de pacientes TOF; en contraste miR-222 promueve la proliferación de cardiomiocitos e inhibe la diferenciación miogénica de células P19, por lo que tanto miR-424/424\* y miR-222 pueden aportar al fenotipo TOF al afectar el desarrollo de los cardiomiocitos (Ver tabla 5.) (419, 427).

**Tabla 5.** microRNAs asociados a la presencia de tetralogía de Fallot.

microRNA	Desregulación	Gen objetivo
miR-222	Aumentado	-
miR-1	Disminuido	Cx43
miR-424/424*	Aumentado	HAS1, NF1
miR-206	Disminuido	Cx43
miR-940	Disminuido	JAR/D2
miR-421	Aumentado	SOX2, SOX4
miR-19b	Aumentado	-
miR-22	Aumentado	-
miR-29c	Aumentado	-
miR-375	Aumentado	-

### **3.19. Factores ambientales asociadas a tetralogía de Fallot**

Las CHD son patologías complejas, a las cuales generalmente se les acepta un origen multifactorial que surge de la interacción de factores genéticos y ambientales (428). Diferentes variantes genéticas interactúan entre ellas, y juntas actúan con factores ambientales aumentando la susceptibilidad a CHD; y a pesar de la gran cantidad de estudios realizados, especialmente durante las últimas décadas, la patogénesis de las CHD persiste sin aclararse (2, 429).

Existen múltiples factores de riesgo maternos relacionados con CHD entre los que se incluyen deficiencias nutricionales, uso de medicamentos, consumo de alcohol, consumo de cigarrillos, e infecciones maternas (385, 430); varios de estos factores se han evidenciado que actúan en un contexto materno preconcepcional, o feto-placenta- madre. Madres con diabetes pre-gestacional presentan hasta un aumento de 5 veces el riesgo en tener hijos con CHD, riesgo que es mayor al reportado por madres con diabetes gestacional (431). Sin embargo, a pesar de los estudios realizados, el mecanismo mediante el cual estos factores inducen CHD es desconocida (385, 432).

Shillingford y Weiner reportaron en el caso de neonatos con síndrome alcohólico fetal, patología causada por el consumo materno de alcohol prenatal, presentan como CHD más frecuente ASD (433). Mientras que un estudio de casos y controles

realizado en España, evidencio que mayor riesgo de desarrollar CHD se encontraba en el grupo con mayor nivel de exposición a alcohol prenatal (434).

Torfs y Christianson reportaron que el consumo materno de cigarrillo se asocia con defectos específicos como AVCD, ASD, y TOF (435). Wang y colaboradores en el 2013 observaron que la amenaza de aborto en estadios tempranos del embarazo era significativamente más alta en pacientes con CHD familiar, que en pacientes con CHD esporádica; mientras que el consumo de cigarrillo fue marginalmente significativa asociada con CHD familiar, no obstante, ellos consideran que este resultado se puede ver influenciado por el tamaño de la muestra del estudio (432).

Simeone y colaboradores en el 2016 estimaron que 304 casos de TOF, en Estados Unidos, podían ser prevenidos anualmente eliminando factores de riesgo modificables, entre los cuales los más importantes en su estudio son sobrepeso-obesidad previo al embarazo, edad por encima de los 35 años y diabetes pregestacional (436).

Aunque factores ambientales y genéticos han sido fuertemente asociados con TOF (437-440), los factores medio ambientales han recibido mayor atención. Factores como rubeola y otras infecciones virales, diabetes mellitus, y exposición a agentes teratógenos como la talidomida durante el embarazo se han asociado a diferentes CHD incluyendo TOF en varios estudios epidemiológicos (441-444). La teoría

predominante es que estas exposiciones ambientales toman lugar durante un período crítico en el desarrollo cardíaco, que resulta en el desarrollo de la TOF (437,442). La clara relación entre ciertas exposiciones y TOF, y las limitaciones en los estudios genéticos en las anteriores décadas ha llevado a que algunos investigadores postulen que los factores ambientales son probablemente más importantes que los factores genéticos en la causalidad TOF (437).

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivo General**

1. Identificar microdeleciones y microduplicaciones reportadas como asociados a cardiopatías complejas tipo tetralogía de Fallot mediante la aplicación de las pruebas moleculares de amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA) e Hibridación genómica comparativa array (Array CGH), en individuos atendidos en un centro de referencia de la ciudad de Cali en el periodo 2011-2015.

### **4.2. Objetivos Específicos**

1. Describir las características clínicas de un grupo de individuos con cardiopatías complejas, tipo tetralogía de Fallot, atendidos en un centro de referencia de la ciudad de Cali en el periodo 2011-2015.
2. Identificar la presencia de síndrome por delección 22q11, mediante la aplicación de la prueba molecular de amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA) en pacientes con Tetralogía de Fallot, atendidos en un centro de referencia de la ciudad de Cali en el periodo 2011-2015
3. Identificar microdeleciones y microduplicaciones mediante la aplicación de las pruebas moleculares de Hibridación genómica comparativa array (Array

CGH), en individuos con estudios negativos para síndrome por deleción 22q11.

## 5. METODOLOGÍA

Para el desarrollo de los diferentes objetivos se realizó:

**5.1. Objetivo 1:** Primero se identificaron aquellos pacientes con diagnóstico de cardiopatía compleja tipo Tetralogía de Fallot, que hayan sido valorados por los servicios de cardiología pediátrica y genética clínica de la Fundación Clínica Valle del Lili durante el periodo comprendido desde enero del año 2011, hasta enero del año 2015. Dicha identificación se llevó a cabo utilizando el código Q21.3 de la Clasificación Internacional de Enfermedades 10° revisión (CIE-10), código utilizado como filtro de búsqueda en el sistema de gestión de historias clínicas (SAP) para la consulta de cardiología pediátrica y genética clínica de la Fundación Clínica Valle del Lili.

Una vez identificados los candidatos para inclusión al estudio, se hizo revisión de las historias clínicas de cada paciente, con el objetivo de identificar aquellos pacientes que realmente presentaran la patología a estudio y que cumplan los criterios de inclusión al estudio. Los pacientes identificados que cumplieron los criterios de inclusión fueron contactados vía telefónica llevando a cabo una estrategia de contacto iterativo de tres a cinco niveles, con el propósito de establecer el estado de vitalidad del paciente e invitar a la presentación del estudio y firma del consentimiento informado.

Para la caracterización demográfica se le aplicó a cada participante del estudio un instrumento tipo encuesta diseñado de manera exclusiva para este estudio, que en primera instancia fue administrado de forma personal con el objetivo de recopilar la información relevante sobre las diferentes variables demográficas de cada individuo. Este instrumento fue administrado por uno de los investigadores principales, en todos los casos (Ver Anexo 1).

Para la caracterización clínica de los pacientes se hizo revisión de la historia clínica de cada paciente en búsqueda de estudios imagenológicos (ecocardiograma, angiotomografía computarizada, resonancia magnética), y procedimientos diagnósticos y/o terapéuticos (cateterismo cardiaco, Intervención quirúrgica); con el objetivo de realizar una adecuada descripción anatomo-patológica del defecto estructural cardiaco de cada individuo a estudio. Los datos recolectados tanto sobre la caracterización clínica, como la demográfica, fueron almacenados en una base de datos tipo Excel para su análisis.

**5.2. Objetivo 2:** Para el desarrollo de este objetivo se contó con el apoyo y entrenamiento del Dr. Julián Nevado, del Instituto de Genética Médica y Molecular del Hospital Universitario La Paz, Madrid; Quién asesoró a los investigadores principales en la técnica de Amplificación Múltiple de Sondas Dependientes de Ligación (MLPA).



Inicialmente se desarrollo el protocolo de Procedimiento Operativo Estandarizado (POE), adaptando la técnica de MLPA a las condiciones locales del Laboratorio de Medicina Genómica de la Universidad Icesi, laboratorio especializado en la elaboración de estudios moleculares en enfermedades huérfanas y anomalías congénitas de la ciudad de Cali, Colombia.

Durante el diseño del POE se utilizó como fundamento el protocolo general para la detección y cuantificación de secuencias de ácidos nucleicos, establecido por la compañía MRC-Holland; y el protocolo ajustado del Instituto de Genética Médica y Molecular del Hospital Universitario La Paz. Durante el desarrollo de dicho proceso se contó con la realización de pruebas piloto y evaluación de calidad mediante el procesamiento de muestras previamente analizadas en el Instituto de Genética Médica y Molecular del Hospital Universitario La Paz, esto con el propósito de evaluar replicabilidad de los resultados y calidad en el procesamiento de las muestras. Acorde a los resultados obtenidos durante este proceso de evaluación, se realizaron ajustes al protocolo operacional de MLPA (Anexo #1).

Para la ejecución del MLPA para la región 22q11, se hizo uso del kit SALSA® MLPA® probemix P250 DiGeorge de MRC-Holland. Este kit es de uso para diagnostico in vitro e investigación de deleciones o duplicaciones en la región 22q11.2 en seres humanos. Este kit incluye, a parte de las sondas para la región 22q11.2, sondas para las regiones 4q, 8p, 9q, 10p, 17p, y 22q13, regiones que han sido asociadas con fenotipos similares a DiGeorge. En los casos donde hubo

resultados inexactos se realizó un segundo MLPA con el kit SALSA® MLPA® probemix P324-A2 22q11, kit que contiene sondas para 34 secuencias de la región 22q11, incluyendo 12 sondas para el gen TBX1, y 10 sondas referencia en otras regiones autosómicas. El análisis de los datos crudos se realizó mediante el software de uso libre coffalyser®.

Los pacientes que consintieron participar en el estudio, se les realizó la toma de muestras biológicas (muestra de sangre y/o epitelio mucosa oral) para extracción de ADN. A las muestras tomadas (Sangre) inicialmente se le realizó Cariotipo bandeo G de 25 metafases, el cuál fue realizado en la Fundación Valle del Lili, con el propósito de identificar cromosomopatías asociadas a la presencia de cardiopatías complejas, en los casos en donde fue requerido la lectura se extendió hasta las 100 metafases. Aquellos pacientes a los que no se les identificó una alteración mediante el cariotipo, fueron posteriormente evaluados mediante las técnicas de MLPA para 22q11, realizado en el Laboratorio de Medicina Genómica de la Universidad Icesi.

**5.3. Objetivo 3:** Los pacientes a los que no se les identificaron alteraciones mediante el cariotipo bandeo G y el estudio de MLPA, se les realizó estudios de citogenética molecular mediante la técnica de Hibridación Genómica Comparativa Array (Array CGH), para la identificación de micro deleciones/duplicaciones que estén asociadas a la presencia de las cardiopatías a estudio.

Este estudio fue realizado por La compañía Sistemas Genómicos, en España, utilizando el CytoScan® 750K Array Kit, de Affymetrix. Este es un array mixto que permite la detección de pérdidas y ganancias de ADN, como las pérdidas de heterocigosidad y las disomías uniparentales. Este microarray tiene una resolución de 750,000 sondas dirigidas al 100% de los genes *International Symposium of Cytogenomic Arrays* (ISCA), 98% de los genes del *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) y 96% de los genes *Reference Sequence* (RefSeq). El análisis de los datos crudos del Array CGH se realizó en el Laboratorio de Medicina Genómica de la Universidad Icesi utilizando el software de acceso libre Chromosome Analysis Suite 3.2® de ThermoFisher Scientific®.

Una vez obtenidos los resultados del Array CGH se realizó un análisis comparativo entre las regiones identificadas como afectadas con CNV por el software Chromosome Analysis Suite 3.2®, y la información recopilada en las bases de datos DECIPHER y ClinVar. Se utilizó como filtro de búsqueda la asociación entre las regiones genéticas identificadas y la presencia de reportes previos con pacientes que exhiben en su fenotipo TOF. Se tomará en cuenta también la contribución patogénica reportada en estas bases de datos para establecer la relevancia de la CNV al fenotipo cardíaco del paciente.

Finalmente se procedió a hacer la entrega de los resultados a los pacientes participantes de los diferentes estudios citogenéticos y moleculares realizados, mediante la asignación de una cita de genética en el área de consulta externa, en

la Fundación Valle de Lili, en donde se le explicó a los pacientes y sus acompañantes los resultados obtenidos, respondiendo las inquietudes que pudieran surgir durante este proceso.

#### **5.4. Criterios de Inclusión**

- Individuos que asistan o hayan asistido a la consulta de cardiología pediátrica y genética clínica de la Fundación Clínica Valle del Lili periodo Enero del año 2011, hasta enero del año 2015.
- Individuos con diagnóstico de cardiopatías complejas tipo Tetralogía de Fallot.
- Individuos con historia clínica registrada en el sistema de gestión y revisión de historias clínicas SAP de la Fundación Clínica Valle del Lili.
- Individuos de cualquier género, edad, raza, que hayan nacido en el sur-occidente Colombiano.

#### **5.5. Criterios de Exclusión**

- Individuos nacidos en municipios de departamentos diferentes al Valle del Cauca, Cauca, Putumayo y Nariño.

## **5.6. Consideraciones éticas**

El diseño y desarrollo de este estudio cumplió con lo estipulado por la Declaración de Helsinki para la investigación en humanos (445). Dada la naturaleza del estudio, este fue considerado de riesgo mínimo. Fue presentado y aprobado por los Comités Institucionales de Ética Humana de la Facultad de Salud de la Universidad Icesi, y el Comité de Ética en investigación Biomédica de la Fundación Valle del Lili.

Se incluyeron padres de cualquier edad, raza o estrato socioeconómico. Se informó a los participantes en qué consistía su participación en el estudio y que este no implicaba riesgo más allá del que pudiese generar la toma de la muestra de sangre.

## **5.7. Análisis estadístico**

Los datos recolectados fueron digitalizados en una base de datos Excel, a la cual se le realizó un análisis estadístico descriptivo mediante distribuciones de frecuencias relativas (%) representadas en tablas y gráficos para describir las características clínicas, sociodemográficas y exposicionales encontradas.

## 6. Resultados

Se realizó la búsqueda de pacientes candidatos al estudio a través del sistema de gestión de historias clínicas (SAP) de la Fundación Valle del Lili, utilizando como criterios de búsqueda pacientes que hayan sido valorados por los servicios de cardiología pediátrica y genética clínica de esta institución, con el diagnóstico *Tetralogía de Fallot*, código CIE-10 Q21.3, en el rango de tiempo comprendido entre enero del año 2011 y enero del año 2015.

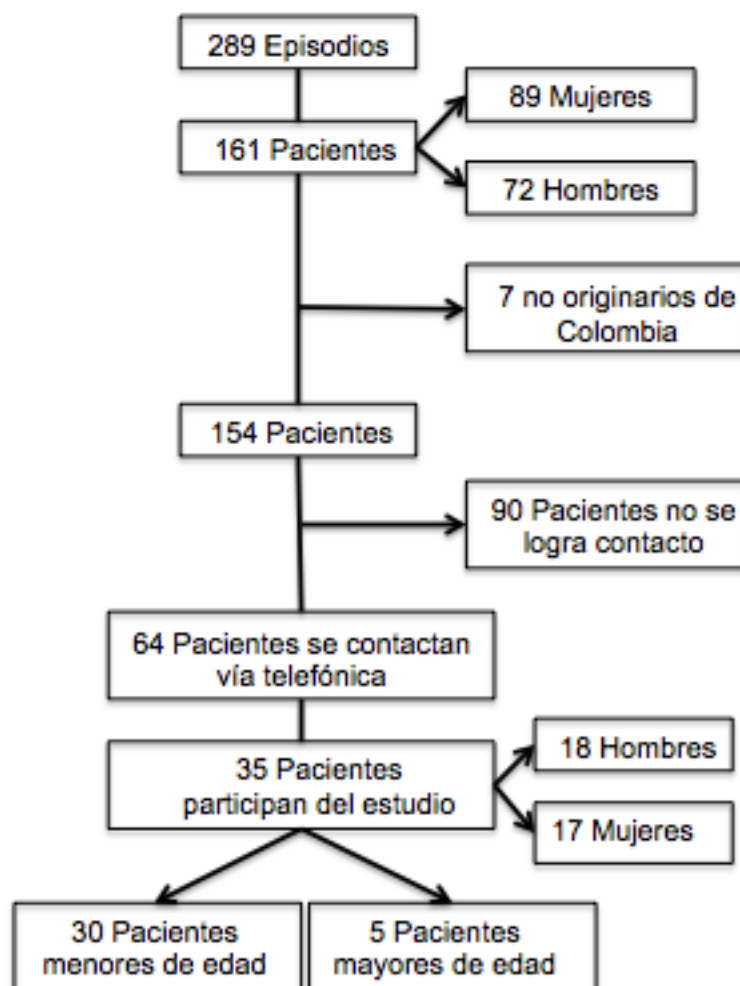
Como resultado de esta búsqueda se identificaron 289 episodios de atención médica a pacientes con TOF entre los años 2011 y 2015, estos episodios corresponden a 161 pacientes, 89 de los cuales corresponden al género femenino, y 72 al género masculino.

De los pacientes identificados, 133 individuos presentan edades menores a los 18 años de edad, mientras que los 28 individuos restantes corresponden a edades mayores o iguales a 18 años. Inicialmente del listado de pacientes con diagnóstico de TOF se excluyen a siete individuos, por ser originarios de otros países diferentes a Colombia. A los 154 pacientes restantes, se les intenta contactar vía telefónica llevando a cabo una estrategia de contacto iterativo de tres a cinco niveles, consistente en llamados telefónicos en diferentes horarios y diferentes días de la semana.

De los 154 pacientes candidatos, se logra contacto telefónico efectivo con 68 de ellos. De los pacientes contactados, 36 aceptan asistir a la presentación del proyecto y firma de consentimiento informado, siendo la dificultad para transportarse y la falta de disponibilidad de tiempo para la cita, las principales causas de abstinencia de los otros 32 pacientes. De los pacientes deciden participar en el proyecto se hace exclusión de uno de los pacientes al confirmar que el paciente tiene como diagnóstico una cardiopatía congénita diferente a TOF.

El grupo definitivo de pacientes reclutados consiste en 35 individuos, entre los cuales se identifican 18 de género masculino (51.42%) y 17 de género femenino (48.58%); distribuidos por municipio de origen de la siguiente manera: 29 (82.86%) originarios de la ciudad de Cali, tres (8.57%) de la ciudad de Popayán, dos (5.71%) de la ciudad de Pasto, y uno (2.83%) de la ciudad de Buga. No se reportaron pacientes nacidos de municipios del departamento de Putumayo (Ver figura 15).

De los pacientes reclutados, 85,71% son menores de edad (30 pacientes), y 14,29% son mayores de edad (5 pacientes). Los pacientes presentaban una distribución por grupos etarios en donde se encuentran dos individuos menores a 1 año (7 y 9 meses respectivamente, 2.86%), 12 individuos de 1 a 5 años (34.28%), 8 individuos de 6 a 10 años (22.86%), 9 individuos de 11 a 20 años (25.71%), y 3 individuos mayores a 21 años (8.57%).



**Figura 15. Reclutamiento de pacientes.** Se incluye distribución del grupo definitivo de 35 pacientes por género.

Dentro de las características epidemiológicas del grupo a estudio se resaltan los siguientes aspectos: 82.9% (29 pacientes) de las madres de los individuos participantes, al momento del estudio, se encontraban en estado civil conyugal, ya



sea baja el ámbito de matrimonio o unión libre; 14.3% (5 pacientes) de las madres refieren encontrarse separadas.

En el 88.6% de los casos el cuidador principal del paciente es su madre (31 casos), en 5.7% (2 casos) se le atribuye a la abuela materna, y en 5.7% (2 casos) al padre. Acerca del nivel académico, 65.7% (23 casos) de las madres culminaron estudios de bachillerato, 8.6% (3 casos) culminaron estudios técnicos, 20% (7 casos) culminaron estudios universitarios, 2.9% (1 caso) realizaron estudios de postgrado, y en el 2.9% (un caso) se reporta solamente haber culminado estudios primarios.

En 31.4% (25 casos) las madres son multigestantes (multíparas), 14.3% (5 casos) primigestantes, y en 14.3% (5 casos) se desconoce el número de gestaciones. En el 82.9% (29 casos) de los casos la edad materna durante la gestación del paciente reclutado se encontraba entre 18 y 35 años de edad, en 5.7% (2 casos) se encontraba por encima de los 35 años de edad, 5.7% (2 casos) en menores de 18 años y en 5.7% (2 casos) se desconoce la edad materna durante la gesta. En 5.7% (2 casos) se reportaron intentos abortivos durante la gesta, en un caso con consumo de aspirinas y en otro caso con zumo de perejil.

Sobre la exposición materna a tóxicos previa a la gestación, en 17.1% (6 casos) refieren antecedente de consumo de cigarrillo, 60% (21 casos) consumo de alcohol, con una periodicidad entre “rara vez”, hasta “frecuentemente”; en 5.7% (2

casos) se identifica consumo de marihuana, 2.9% (1 caso) consumo de marihuana concomitante al uso de popers. Es importante resaltar que en 1 caso hay antecedente de exposición a radiación nuclear y en 14.3% (5 casos) se desconoce la exposición a tóxicos previa a la gestación.

Durante la gestación se identificó exposición a diferentes tipos de tóxicos, siendo la más frecuente el consumo a cigarrillo evidenciado en 8.6% (3 pacientes) de los casos. Consumo de alcohol fue reportado en 5.7% (2 pacientes) de los casos, no hubo referencia a consumo de sustancias psicotrópicas durante la aplicación de la encuesta, pero en 5.7% (2 pacientes) refieren exposición a pesticidas durante la gestación.

Las patologías más frecuentes reportadas durante la gestación fueron: infección del tracto urinario/ infección vaginal en el 40% de los casos (14 pacientes), 20% presentaron amenaza de aborto (7 pacientes), 17.1% (6 pacientes) historia de preclampsia, y en 11.4% (4 pacientes) amenaza de parto pretérmino. Estas 4 patologías corresponden a más de 88% de lo referido por los participantes (Ver tabla 6).

**Tabla 6.** Patologías identificadas durante la gestación.

40% (14 casos)	ITU/IVU
20% (7 casos)	AMENAZA DE ABORTO
17.14% (6 casos)	PRECLAMPSIA
11.43% (4 casos)	AMENAZA PARTO PRETERMINO
8.57% (3 casos)	HTA INDUCIDA POR EL EMBARAZO
5.7% (2 casos)	DIABETES GESTACIONAL
5.7% (2 casos)	HIPEREMESIS GRAVIDICA
2.9% (1 caso)	ANEMIA
2.9% (1 caso)	BEBE MACROSOMICO
2.9% (1 caso)	BRONQUITIS
2.9% (1 caso)	HIDRONEFROSIS
2.9% (1 caso)	MIOMATOSIS UTERINA
2.9% (1 caso)	POLIHIDRAMNIOS
2.9% (1 caso)	RCIU
2.9% (1 caso)	RUBEOLA
2.9% (1 caso)	TOXOPLASMOSIS
2.9% (1 caso)	VIH

En 62.9% de los casos (22 pacientes) refieren el fin de la gestación a término, en 28.6% (10 casos) fueron nacidos pretérmino, y en 17.1% desconocen su edad gestacional al nacimiento (3 casos). El diagnóstico de la TOF se realizó en 14.3% (5 pacientes) durante el periodo prenatal, en 11.4% (4 pacientes) durante el primer día de nacido, y en 74.3% (26 pacientes) el diagnóstico fue posterior al primer día de nacimiento variando entre 2 días y 51 años de edad. Al excluir los casos en donde se realizó diagnóstico prenatal de CHD, y el caso en donde el paciente fue diagnosticado en una edad desmesuradamente tardía, el promedio de diagnóstico postnatal de TOF fue a los 37 días posteriores al nacimiento.

En 34.3% (12 pacientes) se identificó el antecedente de anomalías congénitas en la familia, en 60% (21 pacientes) no refieren antecedentes familiares de este tipo, y en 14.3% (5 pacientes) de los casos es desconocido. El antecedente familiar más frecuentemente reportado fue la presencia de cardiopatías congénitas 17.1% de los casos, de las cuales 4 casos fueron CHD no especificadas, 1 caso de comunicación interauricular (CIA), y un caso de válvula aórtica bivalva. Asociadamente se identificó el antecedente familiar en 3 casos de soplos cardíacos, pero no se estableció asociación con alteraciones estructurales, por lo que se consideraron como soplos inocentes.

### **6.1. Resultados Cariotipo bandeo G**

Se realizan estudios de cariotipo bandeo G a los 35 pacientes participantes, dicha prueba se realizó aplicando los protocolos institucionales de La Fundación Valle de Lili, y bajo los estándares de calidad establecidos por esta institución. La lectura de los cariotipos se realizó inicialmente entre 15 y 25 metafases, pero en los casos en donde fuera necesaria aumentar la cantidad de lecturas debido a hallazgos anormales (Ej. mosaicos) se escaló hasta la lectura de 100 metafases.

Se obtuvo como resultado hallazgo de cariograma normal en 29 de los casos, 13 de los casos correspondieron a cariotipo 46,XX y 16 casos a 46,XY. En 4 de los casos se hizo diagnóstico de trisomía 21 (Síndrome de Down), dos de los cuales con fórmula cromosómica 47,XX+21, y los otros dos 47,XY+21. Durante el estudio se evidenciaron dos casos de mosaicismo genético, un caso de mosaico de Síndrome de Down, con fórmula cromosómica 46,XX[23]/47,XX+21[2] ; y un caso 46XX (46, XX, der(7)t(7;14)(q36;q21)[1]/46, XX [99]) (Ver tabla 7.).

**Tabla 7.** Resultados Cariotipo bandeo G.

Número de Pacientes	Cariotipo Bando G
13	46XX
16	46XY
2	47XY+21
2	47XX+21
1	46XX (46, XX, der(7)t(7;14)(q36;q21)[1]/46, XX [99])
1	46,XX[13]/47,XX+21[2]

## **6.2. Resultados amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples 22q11.**

Para el estudio de deleciones 22q11 se excluyeron a los cuatro pacientes con diagnóstico de Síndrome de Down (se incluyó en el grupo de pacientes por evaluar a los casos con hallazgo de mosaico genético, debido a que presentan un fenotipo muy atenuado). De los 31 pacientes por evaluar, 7 casos tenían estudios previos de deleción 22q11 mediante técnicas de MLPA o Hibridación fluorescente in situ (FISH), de los cuales 5 casos tienen resultado positivo, y 2 casos negativos para deleción 22q11.

Para el estudio de deleción 22q11 por MLPA, se procesan 29 muestras de los 31 pacientes con estudio negativo sindromático mediante técnica de cariotipo bandeado G. Se hace excepción en 2 casos debido a que presentan estudios recientes positivos para deleción 22q11, y su estado clínico dificultaba la toma de una muestra biológica. De los 31 casos estudiados, 9 presentaron hallazgos positivos para deleción de la región 22q11 (Ver tabla 8.).

**Tabla 8.** Resultados amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA) para deleción 22q11.

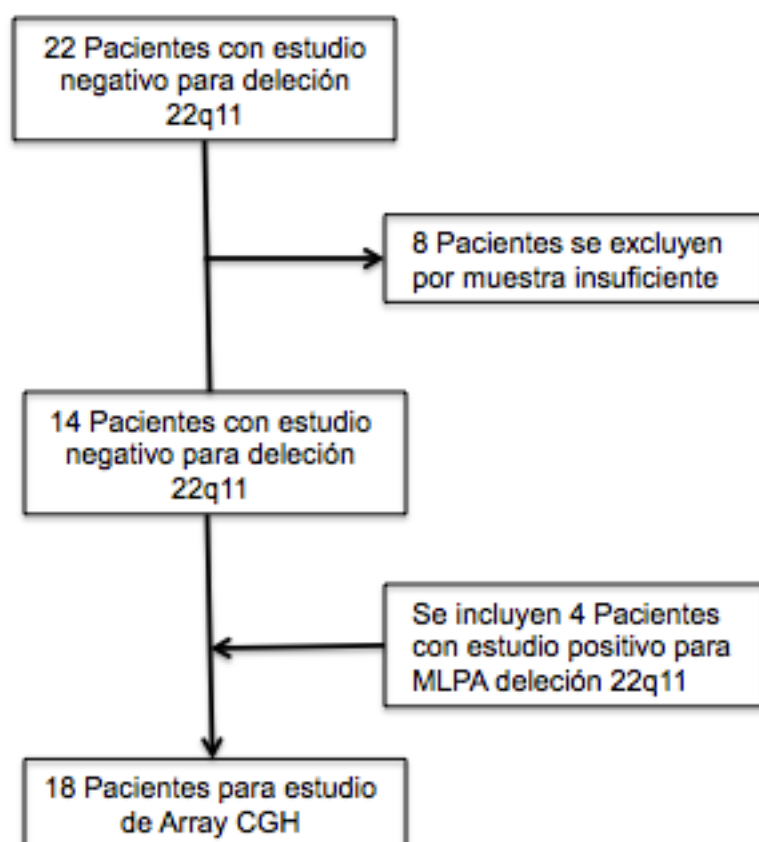
		Género		Total por resultado
		Masculino	Femenino	
Deleción 22q11	Positivo	4	5	9
	Negativo	12	10	22
Total por género		16	15	31

Pacientes 9, 15, 17, 21 se excluyen por diagnóstico de Trisomía 21 (Síndrome de Down).



### **6.3. Resultados Hibridación Genómica Comparativa Array**

Posterior a la realización de los estudios de cariotipo bandeo G y MLPA para delección 22q11, se consideró realizar estudios de Array CGH a los 22 casos con resultados negativos, sin embargo, por dificultades en la cantidad de muestra disponible para el análisis, solo fue posible realizar dicho estudio en 14 de los casos con reporte negativo para delección 22q11. Adicionalmente se decide realizar estudio de Array CGH a 4 casos con resultado positivo para delección 22q11, con el propósito de corroborar y garantizar los resultados obtenidos mediante la técnica de MLPA realizada localmente. En total se procesaron 18 muestras de los pacientes reclutados para el estudio (Ver figura 16.).



**Figura 16. Pacientes procesados mediante hibridación genómica comparativa array.**

De los casos procesados, los cuatro pacientes con hallazgos previos positivos para delección 22q11, presentaron resultados congruentes en el estudio de Array CGH. De los 14 pacientes con hallazgo negativo para delección 22q11 en los estudios de MLPA, se encuentra que 10 de estos presentan delecciones o duplicaciones que han sido previamente asociadas en las bases de datos DECIPHER y ClinVar con la presencia de fenotipos clínicos asociados a TOF (delecciones y duplicaciones diferentes a la región 22q11). En 3 de los pacientes

los hallazgos no son congruentes con reportes previos de pacientes con fenotipos que incluyen TOF; y en un caso la calidad de la muestra de ADN fue insuficiente durante el procesamiento del Array CGH, por lo que se obtiene un resultado negativo (serial 29).

En los pacientes valorados se identificó la presencia de síndromes genéticos diferentes al síndrome por delección 22q11, entre los que se incluye un caso de síndrome por delección 19p13.3 , región que también compromete el gen STK11, asociado al síndrome de Peutz Jegher, patología que afecta el sistema gastrointestinal, y se asocia con pólipos, cáncer gastrointestinal y/o pancreático (MIM 175200); tres casos de síndrome por duplicación 9q34.3; y un caso de síndrome por delección 18p- (MIM 146390) (Ver Tabla 9.).

**Tabla 9.** Resultados Hibridación Genómica Comparativa Array (Array CGH).

Serial	Hallazgos CGH arr[GRCh37]	Resultado asociado TOF	Tamaño Kbp
1	19p13,3 (770324-1351221) x1	Pérdida 19p13,3	580
2	14q32.33(106251069-107184555)x3	Ganancia 14q32.3	933
5	8q24.3(142149466-142679502)x3	Ganancia 8q24.3	530
	20q13.33(60778132-61438884)x3		
	10q26.3(134411047-135190432)x3		
	5p15.33(2402960-2816986)x3	Ganancia 10q26.3	779
	16q24.1(85185677-85645027)x3		
	4q35.2(190292924-190742740)x3		
	7p22.3(120260-727234)x3	Ganancia 9q34.3	1163
	11p11.12(50306192-51401795)x1		
	20q13.33(61791452-62347395)x3		
	8q24.3(143169754-143757306)x3	Ganancia mosaico 6q26	9806
	14q32.33(106099298-106530460)x3		
	9q34.3(138978513-140141288)x3		
	Yp11.2(5109832-5681000)x2	Ganancia 16p11.2	1003
	6q26q27(161108298-170914297)x2-3		
	1p36.33p36.32(1988908-3627839)x3		
	16p11.2(32860753-33863672)x3	Ganancia 16q24.2	724
	16p13.3(1052600-1614240)x3		
	16q24.2q24.3(88301983-89025741)x3		
	5p12q11.1(45854178-49568724)x1		
6	14q32.33(106089648-106740452)x3	Ganancia 14q32.33	651
7	20q13.33(60778132-61336258)x3	Ganancia 9q34.3	656
	10q26.3(134431282-135203443)x3		
	14q32.33(106099298-106712665)x3	Ganancia 1p36.32	459
	9q34.3(139393340-140049204)x3		
	1p36.32(3168767-3627839)x3	Ganancia 8q24.3	518
	1p36.33p36.32(2003054-2904645)x3		
	8q24.3(143326401-143844146)x3	Ganancia 16q24.2	863
	16q24.2q24.3(88301983-89165349)x3		
	12p11.1q12(34537705-38385512)x1		

8	12p11.22(28892643-29584825)x3,	Pérdida 18p11.32	2903
	18p11.32p11.31(136227-3039475)x1		
	18p11.32q11.2(136227-21251243)x1-2	Pérdida mosaico 18p11.32	21115
10	1p36.32(2775081-3614923)x3	Ganancia 1p36.32	840
	8q24.22(131856866-133023163)x1		
	1p33(49271310-49678990)x1		
	4q24(105046117-105483092)x1		
	Xq21.33(96317067-96720177)x2	Ganancia Xq21.33	403
	8q11.1(47204071-47807237)x1		
	14q12(24967063-25389670)x1		
	11p11.12(50306192-51462934)x1		
	8q24.3(143160064-143865737)x3	Ganancia 8q24.3	706
	20q13.33(60772851-61420278)x3		
	16p13.3(549826-1005608)x3		
	11q14.2(87607931-88024051)x1		
	Xq21.31(88878700-90018009)x2	Ganancia Xq21.31	1139
	10p11.21(36637020-37105589)x3		
	Xp21.1(33360288-33990988)x2		
	2p16.1(56617401-57024053)x1		
	3q13.32(117602344-118036207)x1	Ganancia Xp21.1	631
	5p12q11.1(45854178-49568724)x1		
	6p11.2q11.1(58472400-62258930)x1		
	11p12(42692426-43148526)x1		
11	10q26.3(134492208-135426386)x3	Ganancia 8q24.3	424
	10q26.13q26.3(126258033-135426386)x2-3		
	8q24.3(143176114-143600023)x3		
	14q32.33(106072250-106766782)x3	Ganancia 1p36.32	472
	1p36.32(3156128-3627839)x3		
	1p36.33p36.32(2185499-2899460)x3	Ganancia 16q24.3	431
	16q24.3(88743923-89174624)x3		
13	10q26.3(134431282-135153283)x3	Ganancia 9q34.3	736
	9q34.3(139027885-139763903)x3		
	4q35.2(190292924-190746990)x3		
	8q24.3(143155984-143844146)x3	Ganancia 8q24.3	688
	20q13.33(60773195-62279543)x3		

	5p15.33p15.31(113576-7865527)x2-3		
	1p36.32(3168767-3627839)x3	Ganancia 1p36.32	459
	16p13.3(536666-1054247)x3		
	8p23.3p23.1(158048-8853528)x2-3	Ganancia mosaico 8p23.3	6695
	1p36.33p36.32(2185499-2950492)x3		
	16p11.2(32524764-33742056)x1		
	16q24.2q24.3(88301983-89165349)x3	Ganancia 16q24.2	863
	8p11.1q11.1(43424102-47478753)x1		
20	1p36.32(3168767-3614923)x3	Ganancia 1p36.32	446
23	1p36.32(3168767-3614923)x3	Ganancia 1p36.32	446
	16q24.3(88743923-89165349)x3	Ganancia 16q24.3	421
24	14q32.33(106259552-106740452)x3	Ganancia 14q32.33	481
29	Negativo	Negativo	
32	1p36.32(2786144-3614482)x3	Ganancia 1p36.32	828
	Xq12(65523669-65932909)x1		
	8q11.1(47204071-47767021)x1		
	11p11.12(49385980-49789981)x1		
	11p11.12(50306192-51462934)x1		
	8q24.3(143155984-143630256)x3	Ganancia 8q24.3	474
	Yp11.2(4904853-5612061)x1		
	3q13.32(117602344-118051557)x1		
	5p12q11.1(45905665-49552685)x1		
	12p11.1q12(34537705-38381205)x1		
	Xp11.21q11.1(58034898-62044757)x1		

Adicionalmente se procesan muestras de los pacientes con serial 03, 04, 12, y 31 que presentan estudio de MLPA para delección 22q11 positivo. Los resultados evidenciados en el Array CGH son congruentes con lo reportado por el MLPA.

## **7. Discusión**

### **7.1. Alteraciones cromosómicas detectadas por cariotipo bandeado G**

En el presente estudio se decide inicialmente filtrar a todos los pacientes mediante el desarrollo de un cariotipo bandeado G, esto debido a la clara asociación entre las CHD y la presencia de aneuploidias cromosómicas; y particularmente en el caso de TOF con las trisomías cromosómicas más frecuentes, particularmente la trisomía 21 (4, 313).

En la población estudiada se evidenciaron en 4 de los casos (11.43% de los participantes) la presencia de trisomía 21 (Síndrome de Down). Es importante nombrar que estos pacientes exhiben un claro fenotipo extracardíaco típico de esta patología, como lo es la baja talla, braquicefalia, fisuras palpebrales inclinadas hacia arriba, pliegues epicánticos, lengua protruida, hipotonía, y déficit cognitivo, e hipotiroidismo (326); sin embargo se optó por no excluirlos del estudio debido a que su selección se realizó de manera aleatoria, y además su inclusión permitiría establecer el porcentaje de pacientes con TOF secundaria a la presencia de trisomía 21 en la población a estudio. Opuesto a los estudios realizados por Gamarra y colaboradores en el año 2013 (330), y Gallo y colaboradores en el 2015 (327), quienes evaluaron y caracterizaron la presencia de CHD en pacientes con diagnóstico de trisomía 21 de origen Colombiano; siendo en este último estudio el único en donde se reporta el hallazgo de TOF en

tres casos (0.57%) de los 527 evaluados, a pesar de que en la literatura internacional este hallazgo está descrito en el 8% de los pacientes afectados (310, 321, 327, 328).

A pesar de la estrecha relación entre la trisomía 21 y las CHD, es poco lo que se conoce sobre los genes causantes del espectro fenotípico cardíaco en este síndrome. Los defectos cardíacos en el síndrome de Down generalmente incluyen defectos del septum atrioventricular, lo que sugiere como candidatos de la región de CHD en trisomía 21, a los genes expresados en estos tejidos durante el desarrollo. La formación del septum atrioventricular requiere la transformación, migración, proliferación, y diferenciación de células de los cojinetes atrioventriculares, septum atrial primario, mesocardio dorsal, y células de la cresta neural, con un posible rol de las células derivadas del epicardio (446, 447).

Estudios realizados durante la última década han delimitado la región crítica de CHD en trisomía 21 a un área de 5.5Mb localizada entre D21S3 y fosfofructoquinasa tipo hepática (PFKL), que contiene 29 genes conocidos y 25 genes predichos. D21S3 ha sido delimitada por los defectos del septum ventricular y PFKL por TOF. Esta región abarca también la molécula de adhesión celular de síndrome de Down (DSCAM) (448, 449).

En este estudio no se encontraron casos asociados a trisomía 13 (síndrome de Patau), y trisomía 18 (Síndrome de Edwards). Aunque dichas alteraciones exhiben



entre sus hallazgos fenotípicos la presencia de CHD en un 90% y 80% respectivamente, su alta tasa de mortalidad, hasta de un 90% durante el primer año posterior al nacimiento, hace improbable que se incluyeran pacientes con estas patologías en la población reclutada. Esto teniendo en cuenta que el paciente más joven reclutado para este estudio tenía una edad de 7 meses al momento de su inclusión (4, 313, 450).

También fueron detectados en este estudio dos casos de mosaicismo genético, un caso de mosaico de trisomía 21, con fórmula cromosómica 46,XX[13]/47,XX+21[2] ; y un caso 46XX (46, XX, der(7)t(7;14)(q36;q21)[1]/46, XX [99]). En el primer caso la paciente no presenta al examen físico hallazgos fenotípicos compatibles con síndrome de Down, a excepción de la CHD tipo TOF. Lo evidenciado en el fenotipo de la paciente es congruente con lo descrito por Fishler y Koch en 1991, y Bhatt y colaboradores en el 1995; quienes describieron la variabilidad fenotípica en pacientes con mosaicismo de trisomía 21, desde un fenotipo que asemeja una trisomía completa, hasta un fenotipo casi normal; lo que se puede explicar por la variación en la proporción células trisómicas entre individuos, y entre tejidos diferentes del mismo individuo (451,452).

Es importante mencionar el estudio de Papavassiliou y colaboradores del 2009, estudio en donde se evaluó la proporción de células trisómicas presentes en tejidos de diferente origen embriológico, sugiriendo que esta relación influye sobre

el resultado fenotípico en casos de mosaicismo de trisomía 21. En este estudio se considera que la variabilidad en los niveles de trisomía entre tejidos se puede deber al recambio y crecimiento celular inherente de cada tejido (453). Adicionalmente observo variación en los niveles de la trisomía a edades más tardías, reportando mayores niveles en los pacientes estudiados (453). Finalmente, este estudio sugiere que la presencia o ausencia de CHD se encuentra más relacionada con los niveles de la trisomía en linfocitos, que en células de la mucosa epitelial, lo que se puede reflejar en el hecho de que tanto la sangre, como el corazón son derivados mesodérmicos. (453,454)

Se considera que, aunque el hallazgo de la trisomía 21 en mosaico puede explicar la presencia de la CHD, el fenotipo atenuado de la paciente y la probabilidad de que exista la co-ocurrencia de mosaicismo de trisomía 21 y microdelección 22q11 justifican progresar con el protocolo diagnóstico del estudio y realizar estudios de MLPA para dicha delección (455).

El segundo caso con cariotipo 46XX (46, XX, der(7)t(7;14)(q36;q21)[1]/46, XX [99]), al examen físico exhibe, aparte de la TOF, estrabismo, y antecedente de retardo del desarrollo psicomotor, el cuál resolvió en el periodo posterior a la corrección de la CHD. Se cree que el hallazgo del mosaicismo, por evidenciarse en una razón de 1:99 metafases, es un mosaicismo de bajo grado, que no presenta relevancia clínica y que puede ocurrir a causa de errores en la mitosis de

células somáticas, motivo por el que se decide realizar estudios de MLPA para delección 22q11 (456-457).

## **7.2. Hallazgos Amplificación Múltiple de Sondas Dependientes de ligandos múltiples 22q11**

Nueve de los pacientes reclutados presentaron hallazgos positivos en las pruebas de MLPA para síndrome por delección 22q11. Dichos pacientes presentaban hallazgos fenotípicos extracardíacos entre los que se incluían: 4 pacientes con retardo del desarrollo psicomotor, 2 con déficit cognitivo, 2 casos con fenotipo característico de síndrome velocardiofacial 1 caso de hipotiroidismo, 1 caso de paladar hendido, 1 caso de voz nasal, y 1 caso de astigmatismo-miopía. Dichos hallazgos han sido descritos tanto en el síndrome de DiGeorge, como en el síndrome velocardiofacial (335,336).

De dichos pacientes se tuvo acceso en cinco casos a sus ecocardiogramas pre-quirúrgicos, los cuáles todos presentaban CHD asociadas. Entre las CHD asociadas se reportan 3 casos con colaterales aorto pulmonares, 3 casos de arteria subclavia aberrante, un caso de ductus arterioso persistente, un caso de atresia pulmonar concomitante con defecto del septo ventricular, y un caso de arco aórtico derecho; este último presentándose concomitantemente a una arteria subclavia aberrante. La presencia de estas CHD asociadas es concordante a lo

descrito en la literatura sobre el fenotipo cardiaco de las deleciones 22q11 (Ver tabla 10.) (312, 313,338, 340-342).

A pesar de que el presente estudio no es comparable con el estudio realizado en Colombia por parte de Salazar y colaboradores, debido a metodología y tipo de población, es relevante contrastar que en dicho estudio de 61 pacientes con diagnóstico clínico de CHD no sindrómica y fenotipo normal, 3 (4.9%) presentaron deleción 22q11.2, de los cuales dos (3.28%) tenían diagnóstico de TOF, y uno presentaba un (1.64%) defecto septal atrial (343). Mientras que en el estudio actual 9 de los casos con TOF presentaron hallazgo positivo de deleción 22q11, dato equivalente al 25.71% de los casos estudiados, o 29% de los casos con fenotipo no compatible con síndrome de Down, porcentajes concordantes con lo descrito en la literatura internacional (310-313, 338, 339). El contraste de estos estudios sugiere que el síndrome por deleción 22q11 podría aportar poco a la etiología de las CHD no sindrómicas, pero ser una de las causas más importantes a descartar en cuadros de TOF síndromática, y no síndromática.

**Tabla 10.** Descripción ecocardiografica pacientes con delección 22q11.

SERIAL	Descripción ecocardiograma	Ecocardiograma Prequirúrgico/Posquirúrgico
003	CIV perimembranosa, atresia pulmonar, colaterales aortopulmonares, vena cava superior izquierda drenaba al seno coronario.	Prequirúrgico
004	Arteria subclavia aberrante, ostium secundum, CIV subaórtico.	Prequirúrgico
012	Insuficiencia pulmonar abierta, insuficiencia tricúspidea moderada, Postoperatorio quirúrgico.	Posquirúrgico
025	CIV subaórtico, cabalgamiento de la aorta sobre el septum interventricular en un 50%, colateral aortopulmonar con shunt de izquierda a derecha, insuficiencia tricúspidea, estenosis severa del tracto de salida del ventrículo derecho	Prequirúrgico
030	Doble lesión pulmonar leve, posquirúrgico	Posquirúrgico
031	Atresia pulmonar con CIV, doble lesión pulmonar sin repercusión, posquirúrgico	Posquirúrgico
033	Tetralogía de Fallot	Desconocido
34	Estenosis valvular pulmonar moderada a severa, hipoplasia de anillo, tronco pulmonar, CIV subaórtico, ductus arterioso restrictivo, no se descarta la presencia de una colateral aortopulmonar ; aorta cabalgando septum interventricular, estenosis infundibular hipoplasia leve del segmento proximal del tronco de la arteria pulmonar con calibre normal de su segmento distal, arco aórtico derecho, arteria subclavia izquierda aberrante.	Prequirúrgico
35	Subclavia aberrante	Prequirúrgico

### **7.3. Hallazgos encontrados mediante Hibridación Genómica Comparativa Array**

Se realizaron estudios de Array CGH a 18 pacientes, de los cuáles 14 casos tienen estudios negativos de MLPA para delección 22q11. De los pacientes evaluados se corrobora el diagnóstico de los 4 casos de delección 22q11. Adicionalmente se detectan otros casos sindrómicos, que incluyen un caso de síndrome por delección 19p13.3 que puede presentarse de manera concomitante con síndrome de Peutz Jeghers, tres casos de síndrome por duplicación 9q34.3, y un caso con síndrome por delección 18p-.

En cinco casos se reportan hallazgos de CNV en regiones que han sido asociadas con TOF no sindrómica, en las bases de datos de ClinVar y DECIPHER; en tres casos no se reporta asociación entre las CNV detectadas y el fenotipo cardíaco exhibido. En un caso se presenta falla en el procesamiento del Array CGH por no tener suficiente muestra biológica (Ver tabla 11.).

**Tabla 11.** Hallazgos Hibridación Genómica Comparativa Array (Array CGH) asociados a la presencia de Tetralogía de Fallot.

Serial	Resultado asociado TOF	Patológico DECIPHER	Patológico ClinVar	Interpretación
1	Pérdida 19p13,3	-	-	Síndrome por microdelección 19p13. Región asociada a fenotipo que incluye CHD y alteraciones faciales. No hay reportes previos de TOF. Región compromete gen STK11 asociado a síndrome de Peutz Jegher, patología que afecta el sistema gastrointestinal, y se asocia con pólipos, cáncer gastrointestinal y/o pancreático.
2	Ganancia 14q32.3	-	-	Región asociada con cadena pesada inmunoglobulina (IGH), no explica fenotipo.
3	Pérdida mosaico 22q11.21 Pérdida 22q11.21	+	+	Síndrome delección 22q11 (Velocardiofacial / DiGeorge síndrome). Explica fenotipo.
4	Pérdida mosaico 22q11.1 Pérdida 22q11.21	+	+	Síndrome delección 22q11 (Velocardiofacial / DiGeorge síndrome). Explica fenotipo.
5	Ganancia 8q24.3	+	+	Región asociada a fenotipo de forma anormal de la cara y TOF.
	Ganancia 10q26.3	-	-	Región asociada a TOF.
	Ganancia 9q34.3	-	-	Síndrome por duplicación 9q34.3, región asociada a fenotipo de anomalías en la oreja, hernia diafragmática congénita, hidrocefalo, y TOF.
	Ganancia mosaico 6q26	-	-	Región asociada a TOF.
	Ganancia 16p11.2	-	-	Región asociada a TOF.
	Ganancia 16q24.2	-	-	Región asociada a fenotipo de discapacidad intelectual, prognatismo, lengua protruida, y TOF.
6	Ganancia 14q32.33	-	-	Región asociada con cadena pesada inmunoglobulina (IGH), no explica fenotipo.
7	Ganancia 9q34.3	-	-	Síndrome por duplicación 9q34.3, región asociada a fenotipo de anomalías en la oreja, hernia

				diafragmática congénita, hidrocefalo, y TOF.
	Ganancia 1p36.32	-	+	Región asociada a fenotipo de anomalías en la oreja, hernia diafragmática congénita, hidrocefalo, y TOF.
	Ganancia 8q24.3	+	+	Región asociada a fenotipo de forma dé la cara anormal y TOF.
	Ganancia 16q24.2	-	-	Región asociada a fenotipo que incluye discapacidad intelectual, prognatismo, lengua protruida, y TOF.
8	Pérdida 18p11.32	-	+	Síndrome por delección 18p-. Región asociada a fenotipo que incluye tronco arterioso persistente y TOF.
	Pérdida mosaico 18 p11.32			
10	Ganancia 1p36.32	-	+	Región asociada a fenotipo de anomalías en la oreja, hernia diafragmática congénita, hidrocefalo, y TOF.
	Ganancia Xq21.33	+	-	Región asociada a fenotipo de retardo del desarrollo del lenguaje, microcefalia y TOF.
	Ganancia 8q24.3	+	+	Región asociada a fenotipo de forma anormal de la cara y TOF.
	Ganancia Xq21.31	+	-	Región asociada a fenotipo de retardo del desarrollo del lenguaje, microcefalia y TOF.
	Ganancia Xp21.1	+	-	Región asociada a fenotipo de retardo del desarrollo del lenguaje, microcefalia y TOF.
11	Ganancia 8q24.3	+	+	Región asociada a fenotipo de forma anormal de la cara y TOF.
	Ganancia 1p36.32	-	+	Región asociada a fenotipo de anomalías en la oreja, hernia diafragmática congénita, hidrocefalo, y TOF.
	Ganancia 16q24.3	-	-	Región asociada a fenotipo que incluye discapacidad intelectual, prognatismo, lengua protruida, y TOF.
12	Pérdida mosaico 22q11.1	+	+	Síndrome delección 22q11 (Velocardiofacial / DiGeorge síndrome). Explica fenotipo.
	Pérdida 22q11.21			
13	Ganancia 9q34.3	-	-	Síndrome por duplicación 9q34.3, región asociada a fenotipo de anomalías en la oreja, hernia diafragmática congénita, hidrocefalo, y TOF.
	Ganancia 8q24.3	+	+	Región asociada a fenotipo de forma anormal de la cara y TOF.
	Ganancia 1p36.32	-	+	Región asociada a fenotipo de anomalías en la oreja, hernia diafragmática congénita, hidrocefalo, y TOF.



	Ganancia mosaico 8p23.3	+	-	Región asociada a fenotipo de Anomalías dentales, nariz bulbosa, discapacidad mental leve, y TOF.
	Ganancia 16q24.2	-	-	Región asociada a fenotipo que incluye discapacidad intelectual, prognatismo, lengua protruida, y TOF.
20	Ganancia 1p36.32	-	+	Región asociada a fenotipo de anomalías en la oreja, hernia diafragmática congénita, hidrocefalo, y TOF.
23	Ganancia 1p36.32	-	+	Región asociada a fenotipo de anomalías en la oreja, hernia diafragmática congénita, hidrocefalo, y TOF.
	Ganancia 16q24.3	-	-	Región asociada a fenotipo que incluye discapacidad intelectual, prognatismo, lengua protruida, y TOF.
24	Ganancia 14q32.33	-	-	Región asociada con cadena pesada inmunoglobulina (IGH), no explica fenotipo.
29	Negativo			Negativo*
31	Pérdida mosaico 22q11.1	+	+	Síndrome deleción 22q11 (Velocardiofacial / DiGeorge síndrome). Explica fenotipo.
	Pérdida 22q11.21			
32	Ganancia 1p36.32	-	+	Región asociada a fenotipo de anomalías en la oreja, hernia diafragmática congénita, hidrocefalo, y TOF.
	Ganancia 8q24.3	+	+	Región asociada a fenotipo de forma anormal de la cara y TOF.

\*Se incluyen pacientes serial 03, 04,12, 31 con resultado previo de MLPA para deleción 22q11: Paciente serial 02 con hallazgo que no justifica fenotipo y paciente serial 29 que presentó falla en el procesamiento del Array CGH.

### **7.3.1. Paciente con síndrome por delección 19p13.3**

En el paciente serial 01 se hace diagnóstico de síndrome por delección 19p13.3. Esta patología ha sido descrita recientemente en una muestra de cuatro pacientes con macrocefalia, bosa frontal, estrabismo divergente, hipoplasia del nervio óptico, retardo del desarrollo, convulsiones, hipotonía, ataxia (458). Nuevos reportes han surgido, entre los que se incluyen casos asociados a la presencia de CHD, entre las que se describen principalmente defectos del septum atrial y defectos del septum ventricular, sin embargo a la fecha no se han descrito casos asociados a TOF (459).

En esta región también se encuentra el gen STK11. Este gen contiene 10 exones que abarcan 23 kb, y codifican una serina/treonina quinasa de 433 aminoácidos. Esta quinasa se considera puede estar involucrada en el arresto del ciclo celular G1, vía de apoptosis dependiente de p53, regulación del factor del crecimiento endotelial vascular, y en la vía Wnt-beta catenina (460).

Diferentes alteraciones en el gen SRK11 han sido asociadas con el síndrome de Peutz Jeghers, entre las cuales las más notables son mutaciones puntuales y delecciones (461, 462, 463). Este síndrome tiene un patrón de herencia autosómica dominante, con una prevalencia estimada entre 1 en 8,300 a 1 en 280,000 individuos; y se caracteriza por la presencia de harmatomas gastrointestinales, hiperpigmentación y lentigos en labios y extremidades; y predisposición a

malignidades gastrointestinales, pancreáticas, pulmonares, mama, útero, ovario, y tumores testiculares (461, 462, 463).

En el caso específico del paciente diagnosticado en este estudio, se considera que puede ser el primer caso de síndrome por delección 19p13.3, que presenta dentro de su espectro clínico cardíaco TOF, otra posibilidad es el compromiso de genes contiguos que pudieran causar un fenotipo cardíaco más severo. Sin embargo no se puede descartar la posibilidad de mutaciones puntuales en otros genes, o la influencia del ambiente como agravante del fenotipo cardíaco. Se requiere realizar seguimiento de la paciente por el riesgo que implica la delección del gen STK11 en el desarrollo de procesos malignos.

### **7.3.2. Pacientes con síndrome por duplicación 9q34.3**

Los pacientes con serial 05, 07, 13 presentaron entre los hallazgos del estudio de Array CGH, la presencia de ganancia génica en la región 9q34.3. Las duplicaciones del brazo largo del cromosoma 9 han sido escasamente reportadas en la literatura, sin embargo, en aquellos casos descritos se describen diferentes anomalías congénitas, entre las que se incluyen: déficit cognitivo, dolicocefalia, asimetría facial, microftalmia, mentón prominente, microstomia, retrognatia, aracnodactilia, camptodactilia, y alteraciones del sistema musculo esquelético (464). De estos hallazgos fenotípicos reportados en la literatura, ninguno es evidenciado en los pacientes reportados, excepto por la presencia de artrosis bilateral de rodillas en uno de los casos. Este caso adicionalmente presenta hipertrofia pilórica, e hipertrofia de adenoides.

La primera descripción clínica de la trisomía parcial 9q como un nuevo síndrome fue realizada en 1975 por Turleau y colaboradores, posteriormente en 1983 Alderdice y colaboradores describieron el caso de una familia con siete individuos afectados por una inserción invertida de un cromosoma 9, que causó la duplicación de la región 9q34 posterior a la recombinación meiótica (465, 466). Otros casos fueron descritos consecutivamente en las décadas de los 80's y 90's, pero en ninguno de estos se evidencio la presencia de TOF (467, 468).

Allderdice diferenci6 los fenotipos asociados a la duplicaci6n distal de 9q en dos grupos, tomando en cuenta la longitud del segmento tris6mico. El grupo I incluye los casos con trisomía 9q31 a 9qter, o 9q32 a 9qter, mientras que el grupo II abarca una duplicaci6n m6s corta de la regi6n 9q34, que en su descripci6n resultaban de la herencia de una translocaci6n desbalanceada en uno de los padres (464,466).

Nuevos casos con mutaciones de novo han sido descritas durante la última d6cada, estos casos son interesantes debido a la expresi6n de TOF en estos pacientes. El primer caso es reportado por Amarillo y colaboradores en el 2015, presenta tres CNV contiguas (triplicaci6n-duplicaci6n-triplicaci6n) en 9q34.2-q34.3 (3.76 Mb; hg19; 137259675-141020389); este paciente present6 concomitante a la TOF ausencia de la v6lvula pulmonar, y en el rostro facies triangulares en asociaci6n a una frente amplia (469). El segundo caso descrito por Liu y colaboradores, describe un paciente de 32 semanas de gesti6n que presenta una duplicaci6n distal de 5.47 Mb en 9q34 y una deleción de 1.25 Mb en 16p11.2 (470). En ambos casos los pacientes presentaron un pobre pron6stico, en el primer caso el paciente fallece horas despu6s del nacimiento secundario a una disfunci6n ventricular e hidrops fetal, y en el segundo caso los padres optan por la terminaci6n voluntaria del embarazo (469, 470).

Estos casos han permitido proponer nuevos genes candidatos asociados a TOF entre los que se incluyen el gen RXRA, una subclase de receptor X retinoide

(RXR) que se une como homodimeros, forma heterodimeros con los receptores de ácido retinoico (RAR), y juntos se unen sinérgicamente a elementos de respuesta del ADN para promover la transcripción de genes que promueven vías específicas de transducción de señales (469). Sin embargo, en los pacientes que presentaron la duplicación 9q34 en el presente estudio, ninguno exhibe compromiso de este gen, lo que puede sugerir una región crítica que afecta genes adyacentes a RXRA. Es importante nombrar que en los tres casos se evidencia compromiso del gen NOTCH1, y aunque su rol en la presencia de CHD ha sido claramente descrito en la literatura, generalmente las CHD que implican NOTCH 1 en humanos y modelos murinos son atribuidos a la haploinsuficiencia de este gen, y no a su duplicación (471-474).

Es llamativo que a pesar de que en la literatura claramente se asocia la duplicación de 9q34 con procesos patológicos, y diferentes casos han sido reportados en la base de datos DECIPHER, entre los cuales se incluyen pacientes que exhiben fenotípicamente TOF, la contribución patogénica de esta CNV en esta base de datos es considerada como incierta (475, 476).

### **7.3.3. Paciente con síndrome por delección 18p**

En el paciente serial 08 se identificó una pérdida de 2.9Mb en la región 18p11.32, esta pérdida se encuentra cubierta en dos reportes registrados en DECIPHER; el primero en un caso de delección de 5.65Mb, con fenotipo de TOF y tronco arterioso; y el segundo con una delección 11.49.Mb y TOF aislada (477,478). La contribución a la patogenicidad en estos reportes es incierta y desconocida, para cada caso respectivamente (477,478). En ClinVar existe el reporte de cuatro pacientes con compromiso en esta región génica, de los cuales uno presenta fenotipo que incluye: convulsiones, TOF, y situs inversus totalis. Esta CNV es considerada de significancia clínica patogénica en esta base de datos (479).

La delección del brazo corto del cromosoma 18 (del 18p) ha sido descrita ampliamente en la literatura, es considerada como una de las más conocidas alteraciones cromosómicas, y múltiples casos han sido descritos desde su primera descripción en 1963 realizada por Jean de Grouchy (480,481). Esta alteración hace referencia a la pérdida total o parcial del brazo corto del cromosoma 18 y sus manifestaciones fenotípicas incluyen: baja talla leve a moderada, retardo mental, microcefalia, ptosis palpebral, pliegues epicánticos, hipertelorismo, orejas protruidas, clinodactilia, déficit cognitivo, CHD que incluye TOF, distonias (480, 481, 482, 483).

Se sospecha que algunos individuos con del18p pueden expresar un fenotipo leve que puede dificultar su diagnóstico, hasta aparición de individuos severamente afectados en generaciones posteriores (481). Reportes realizados durante la última década apoyan esta noción, sugiriendo la presencia de variantes eucromáticas benignas en esta locación cromosómica (484).

Schaub y colaboradores en el 2002, buscaron determinar el tamaño y origen parental de la delección 18p en una muestra de individuos afectados. Este estudio mostró la presencia de un clúster de puntos de quiebre entre los marcadores D18S852 en 18p y D18S1149 (4Mb), con un origen parental balanceado entre madres y padres. Sin embargo, más estudios son requeridos para mapear en mayor detalle esta región e identificar un posible mecanismo de ruptura (485).

El caso identificado en el presente estudio se caracteriza por un fenotipo que incluye: cara redonda, leve hipertelorismo, puente nasal amplio, nares evertidas, apiñamiento dental, TOF y déficit intelectual, características descritas dentro del fenotipo del síndrome Del 18p. Llama la atención que la región comprometida coincide con la descrita por Srebniak y colaboradores en su reporte sobre pacientes con diagnóstico prenatal sin efecto fenotípico; sin embargo esto contrasta con lo evidenciado en DECIPHER y en ClinVar, aunque los pacientes reportados en estas bases de datos tienen un compromiso de mayor tamaño. Se considera que los hallazgos fenotípicos evidenciados por los pacientes con



compromiso de la región 18p11.32 son de interés para determinar una adecuada correlación fenotipo-genotipo en el síndrome de del 18p, pero más estudios y reportes de caso son requeridos para dicho propósito.

#### **7.3.4. Pacientes con variantes de copia numérica en regiones asociadas a tetralogía de Fallot**

Los pacientes identificados por los seriales 05, 07, 08, 10, 11, 13, 20, 23, 24, y 32 presentaron en los resultados del estudio de Array CGH, la presencia de CNV's en diferentes regiones que han sido reportadas en las bases de datos DECIPHER y ClinVar asociadas a pacientes con fenotipo que incluye TOF (Ver tabla 12.) (475,486).

Dentro de las regiones identificadas llama la atención la presencia de CNVs comunes a varios de los pacientes reclutados, estas CNVs son: la ganancia 1p36.3, ganancia 8q24.3, y la ganancia 16q24; en esta última reportándose ganancias en las regiones 16q24.2. y 16q24.3 .

**Tabla 12.** Variantes de copia numérica en regiones asociadas a tetralogía de Fallot.

Variante de Copia Numérica	Serial Paciente
Ganancia 1p36.32	7
	10
	11
	13
	20
	23
	32
Ganancia 8q24.3	5
	7
	10
	11
	13
	32
Ganancia 16q24.2	5
	7
	11
	13
Ganancia 16q24.3	23

#### **7.3.4.1, Pacientes con ganancia 1p36.3**

En siete de los pacientes estudiados se detectó la presencia de ganancia en la región 1p36.3, esta región se encuentra reportada en DECIPHER en un paciente con fenotipo que incluye anomalías de la oreja, hernia diafragmática congénita, hidrocefalia, y TOF. En ClinVar se identifica un segundo caso de un paciente con TOF y retardo del desarrollo (475, 486, 487, 488). Los hallazgos asociados a TOF descritas en los pacientes reportados en estas bases de datos, no se evidencian en los pacientes a los que se les identifico esta CNV en el presente estudio.

Es importante mencionar que en DECIPHER, esta duplicación presenta una contribución a la patogenicidad que no se encuentra determinada; mientras que en ClinVar, para el paciente reportado es considerada como patogénica (475, 477, 478, 479). Al expandir la búsqueda en la literatura se encuentra la publicación de Korshunov y colaboradores en el 2007, quienes sugieren la asociación entre ganancias en 1p36 y la diseminación sintomática leptomenígea de glioblastomas supratentoriales (489), sin embargo no se identifican otros reportes en donde se relacione la ganancias en 1p36.3 con TOF.

Cuando se analizan los pacientes a los que se les detectó la ganancia 1p36.3, tomando como referencia el caso serial 32, donde se detecta la duplicación de mayor tamaño (828 Kbp), se identifican 7 genes OMIM, de los cuales solamente

PRDM16 (MIM: 605557) se asocia con alteraciones a nivel cardiovascular, entre las que se incluyen: Cardiomiopatía dilatada, y la no compactación del ventrículo izquierdo (490).

Los escasos reportes en la literatura, y la presencia de solo dos casos reportados en DECIPHER y ClinVar, sugieren una pobre asociación entre esta región citogenética y la aparición de TOF. Cabe mencionar que tanto en el caso descrito en DECIPHER, como en los casos detectados en este estudio (excepto por el caso serial 20), se detectan otras CNV's concomitantes que podrían ser las responsables de la aparición de TOF. Similar a otros escenarios previamente descritos, no se puede descartar la posibilidad de mutaciones ambientales o de la influencia ambiental sobre la presencia de CHD en los pacientes evaluados.

#### **7.3.4.2. Pacientes con ganancia 8q24.3**

En seis de los casos estudiados se presenta ganancia en la región 8q24. Esta región ha sido reportada en DECIPHER en un paciente con hallazgos clínicos que incluyen fenotipo de forma anormal de la cara y TOF (475, 491), y en ClinVar en un paciente con duplicación 8q22.1-24.3, con fenotipo que incluye: retrognatía, puente nasal ancho, criptorquidia, hipertelorismo, y TOF; hallazgos que no se evidencian en los pacientes estudiados a excepción de la TOF (486, 492). En

ambos casos reportados por estas bases de datos se determinó que la contribución a la patogenicidad de estas CNVs era patogénica (491, 492).

Es relevante mencionar que tanto en el caso reportado en DECIPHER y como en el caso en ClinVar, se presentaron ganancias de tamaños significativos, 39.78Mb y 47.68Mb respectivamente (491, 492); mientras que, en los casos detectados en el presente estudio, las ganancias en esta CNV varían entre 472 Kbp (Serial 32) a 706Kbp (Serial 10).

Al buscar en la literatura por otros reportes que asocien pacientes con ganancias en la región 8q24.3 y un fenotipo que exprese TOF, no se encuentran otros casos. No obstante, se evidencian reportes que asocian dicha ganancia como marcador predictivo para positividad de los ganglios linfáticos en el cáncer colon rectal (493), y también ha sido detectado en Astrocitoma anaplásico multifocal (494).

Este hallazgo en la literatura es llamativo debido a la relación que existe entre el cromosoma 8 y el síndrome del Valle de San Luis (Síndrome del cromosoma 8 recombinante), patología poco frecuente que ha sido asociada con retardo del desarrollo, y que se describe generalmente en individuos de descendencia hispana, particularmente del Sur-Oeste de los Estados Unidos (495). Este síndrome se caracteriza por presentar duplicación 8q , en asociación a delección 8p e inversión del cromosoma 8 (rec(8)dup(8q)inv(8)(p23.1q 22.1), y los casos

descritos son derivados de una inversión pericéntrica parental , inv(8)(p23.1q22.1) (495, 496).

El Síndrome del Valle de San Luis se encuentra asociado con CHD, y particularmente TOF (495). Gelb y colaboradores en revisión de 1991 encontraron que el 37.8% de los pacientes evaluados con Síndrome del cromosoma 8 recombinante presentaban TOF (495). Ellos en este estudio también evaluaron 20 pacientes con duplicaciones del brazo largo del cromosoma 8, describiendo como estas duplicaciones aparecían de manera variable entre la región 8q13 y 8q24, y se extendían hasta 8qter; evidenciando CHD en 45% de los pacientes con la duplicación, entre los cuales un caso presentó TOF (495). Es relevante mencionar que la delección 8p23, de manera aislada, se asocia estrechamente a TOF, esto posiblemente por su efecto sobre el gen GATA4, (331,332).

Los hallazgos en este estudio y lo descrito en la literatura sugiere que el cromosoma 8 juega un rol importante en la presencia de CHD y especialmente de TOF, sin embargo se podría atribuir a que la región crítica causal de estas alteraciones cardiacas se deben al efecto sobre el brazo corto (8p), ya sea por efecto de una delección aislada, o por un rearrreglo más complejo como el que se observa en el Síndrome del Valle de San Luis, por lo cual es difícil establecer un asociación fuerte entre TOF y las duplicaciones del brazo largo del cromosoma 8, como lo es la ganancia 8q24.3.

#### **7.3.4.3. Pacientes con ganancia 16q24**

En 5 casos se identificaron ganancias en la región 16q24, específicamente cuatro casos que comprometen el locus 16q24.2, y un caso en 16q24.3. Las Ganancias en esta región han sido reportadas en DECIPHER en un paciente con hallazgos clínicos que incluyen discapacidad intelectual, prognatismo, lengua protruida, y TOF (497). Este paciente concomitantemente presenta otras CNV's en el cromosoma 13 y 15, las cuáles se determinaron fueron heredadas de padres con fenotipo normal (497). La ganancia reportada en este caso es de 1.40Mb, y hasta el momento en que hizo la revisión, la contribución patológica de esta CNV es considerada desconocida (497).

En los pacientes del presente estudio a los que se les evidenciaron ganancias en 16q24, no se les encontró fenotipo concordante al caso reportado en DECIPHER; sin embargo, es relevante resaltar que estos casos no presentan ganancias mayores a 863Kbp, lo cual es sustancialmente menor a lo reportado en DECIPHER. Al buscar en ClinVar por casos con TOF asociados a ganancias en esta región, no se evidencia ningún reporte (486).

En la literatura, no se identifican otras asociaciones entre CNV's en 16q24 y fenotipos que incluyan CHD, incluyendo TOF. Se reportan múltiples estudios que sugieren una clara relación entre trastornos del espectro autista, y déficit cognitivo

con deleciones en 16q24; pero dicho fenotipo no se identifica en los pacientes con ganancias 16q24 valorados en el presente estudio (498, 499).

Se considera que los hallazgos descritos en las bases de datos y literatura exhiben una pobre o nula asociación entre ganancias 16q24 y la presencia de TOF, por lo que se considera que la presencia de CHD en los pacientes evaluados en este estudio se puede atribuir a la presencia de otras CNV's u otras alteraciones genéticas y/o ambientales descritos previamente en este documento.

#### **7.3.5. Pacientes con variantes de copia numérica específicas**

Los pacientes identificados con los seriales 05, 08, y 10 presentaron entre sus resultados de Array CGH, la presencia de CNV's específicas que fueron únicas para cada paciente. Estas CNV's fueron asociadas en DECIPHER y/o ClinVar con reportes de otros pacientes que exhibieron en su fenotipo TOF, sin embargo, aunque estas bases de datos establecen un precedente de posible causalidad, en la mayoría de los casos su contribución a la patogenicidad es considerada benigna o incierta (Ver tabla 13.).

En el paciente serial 05 se identificaron 6 CNV's de las cuales tres eran específicas a este individuo, estas CNV's son: Ganancia 10q26.3, ganancia mosaico 6q26, ganancia 16p11.2. Ganancias en 10q26.3 han sido reportadas en



la base de datos ClinVar en 31 individuos con fenotipos que incluyen retardo del desarrollo, anomalías faciales, síndrome convulsivo, y autismo; de los 31 casos reportados solamente uno presenta en su fenotipo la presencia desde TOF, el cual se presenta concomitante con autismo. La contribución patológica de esta CNV es considerada como benigna, y reportes en otras bases de datos como DECIPHER y en la literatura no evidencian otros casos similares (500).

La ganancia 6p26 se encuentra reportada en DECIPHER y ClinVar; en el primer caso reportan un paciente con déficit cognitivo y TOF, mientras que en el segundo reportan un paciente 6q26 (chr6:161625929-161812380)x4 con TOF aislada. Dichos hallazgos fueron considerados benignos o de significado incierto por las bases de datos referenciados. No se identifican otros reportes de relevancia sobre esta CNV en la literatura, ya sea en el escenario de una ganancia completa o mosaicismismo genético (501, 502). La escasa información sobre ganancias 6p26 que afectan el total de las poblaciones celulares hace difícil predecir el efecto de la misma en el escenario de un mosaicismismo genético; sin embargo, la poca información recopilada permite asumir que existe una pobre asociación de esta CNV como causal de TOF.

Ganancias en la región 16p11 se encuentran reportadas en la base de datos ClinVar en donde registran 72 casos, de los cuales en solo un caso se registra el hallazgo de TOF, con una contribución patológica de benigna/probablemente benigna (503). En DECIPHER no se reportan casos asociados, y en la literatura se

registra en el estudio de Lazier y colaboradores sobre Array CGH en fetos con CHD, en donde entre los pacientes participantes se diagnostica un caso de duplicación 16p11.2 de 212.8kbp, con fenotipo de TOF y doble tracto de salida del ventrículo derecho. El caso reportado por Lazier se considera que es una CNV patogénica, con penetrancia variable (504). Esta región incluye el gen SH2B1, que se encuentra asociado con un espectro fenotípico que varía de normal a retardo del desarrollo y autismo, con anomalías congénitas que incluyen CHD; se estima una penetrancia de esta CNV en aproximadamente el 11% de la población (504).

A pesar de que el estudio de Lazier y colaboradores establece un precedente y propone un gen candidato, este gen no se encuentra comprometido en el paciente diagnosticado en el estudio actual, por lo que la posible causalidad de TOF de esta CNV en el paciente estudiado es poco probable. Es importante mencionar que el paciente con serial 05 no presenta hallazgos sugestivos de comportamiento dentro del espectro autista o de déficit cognitivo.

En el paciente serial 10 se identifican ganancias en las regiones Xq21 y Xp21, estas regiones se sobreponen en un caso registrado en DECIPHER, con fenotipo que incluye retardo del desarrollo del lenguaje, microcefalia y TOF (505). Esta ganancia es catalogada como patogénica en esta base de datos, pero a pesar de que este reporte incluye la presencia de TOF, se considera que dicho caso no es similar al paciente referido en este estudio, debido a que el reporte de DECIPHER presenta una ganancia de 155.08Mb que abarca tanto la región Xp21 como la

región Xq21; a diferencia del paciente serial 10 cuyas CNV's no superan los 1.1Mb. En ClinVar no se registran reportes similares.

Al expandir la búsqueda asociativa en la literatura internacional se identifica un caso con alteraciones citogenéticas complejas que implica duplicación completa del brazo corto del cromosoma X , en asociación a fenotipo de TOF, anomalía de Dandy-Walker, y ambigüedad genital en un feto XY (506). Hombres con dup(Xq) han sido reportados con características de baja talla, déficit cognitivo, dificultades en la alimentación, microcefalia, dismorfismo facial, hipotonía, y genitales hipoplásicos; estos hallazgos no son evidenciados en el caso actual, por lo que se considera que el tamaño de la duplicación no afecta regiones críticas que generen dicho fenotipo (507, 508). Las ganancias detectadas en el caso actual comprometen los genes TGIFLX (MIM 300411), y DIAPH2 (MIM 300108), los cuales no han sido asociados con TOF, por lo que se consideran que dichas ganancias no son responsables de la clínica del paciente.

En último lugar, el paciente identificado con el serial 13, entre las varias CNV's identificadas se incluye una ganancia en mosaico de 8.7Mb en 8p23.3 . Esta ganancia coincide con un reporte de dos pacientes descrito en DECIPHER con fenotipo que se caracteriza por la presencia de anomalías dentales, nariz bulbosa, discapacidad mental leve, y TOF. Esta ganancia se considera como probablemente patogénica para estos casos (509), sin embargo, en otras bases de datos como ClinVar, no se reportan casos similares. El presente caso

identificado en este estudio, a parte de la CHD, no exhibe los otros hallazgos fenotípicos descritos en los casos reportados en DECIPHER.

En la literatura se discute ampliamente sobre si las duplicaciones 8p23 son verdaderas variantes eucromáticas, o si tienen un aporte clínico relevante. En gran parte esta discusión surge inicialmente por la expresión, claramente patológica, del síndrome por duplicación 8p23.1, síndrome con hallazgos clínicos clásicos que incluyen: Retardo del desarrollo, problemas de aprendizaje, déficit de atención e hiperactividad, CHD, y dismorfismos leves (510). Una región crítica de 3.68Mb ha sido determinada como CNV patogénica en el caso de su duplicación y justifica los hallazgos clínicos de este síndrome (511).

Dentro de esta región descrita se incluye el gen GATA4 el cual se asocia con el fenotipo cardíaco de esta patología, dentro de la cual se incluye TOF (331, 332, 510, 512); sin embargo, en el paciente serial 13 del estudio actual, no se compromete la región crítica del síndrome 8p23.1, ni el gen GATA 4. Cabe mencionar que varios individuos con múltiples tipos de rearrreglos del brazo corto del cromosoma 8 (duplicaciones 8p, inversiones pericéntricas, duplicaciones aisladas 8p23, deleciones 8p23) han sido reportados, de los cuales un grupo significativo son fenotípicamente normales (513, 514). Por esto se considera que la ganancia en mosaico 8p23.3 reportada en este estudio presenta una baja probabilidad de ser responsable del fenotipo cardíaco del paciente estudiado.

**Tabla 13.** Variantes de copia numérica específicas asociadas a tetralogía de Fallot.

Serial	Resultado asociado TOF	Patológico DECIPHER	Patológico ClinVar	Interpretación
5	Ganancia 10q26.3	-	-	Región asociada a TOF.
	Ganancia mosaico 6q26	-	-	Región asociada a TOF.
	Ganancia 16p11.2	-	-	Región asociada a TOF.
10	Ganancia Xq21.33	+	-	Región asociada a fenotipo de retardo del desarrollo del lenguaje, microcefalia y TOF.
	Ganancia Xq21.31	+	-	Región asociada a fenotipo de retardo del desarrollo del lenguaje, microcefalia y TOF.
	Ganancia Xp21.1	+	-	Región asociada a fenotipo de retardo del desarrollo del lenguaje, microcefalia y TOF.
13	Ganancia mosaico 8p23.3	+	-	Región asociada a fenotipo de Anomalías dentales, nariz bulbosa, discapacidad mental leve, y TOF

### **7.3.6. Otros Hallazgos Hibridación Genómica Comparativa Array**

Otros hallazgos evidenciados mediante la técnica de Array CGH hacen referencia a los pacientes con serial 03, 04, 12, 31. A estos pacientes se les detectó inicialmente mediante estudios de MLPA deleciones en la región 22q11, posteriormente con la ejecución del array CGH se encuentran resultados concordantes que confirman el diagnóstico de síndrome por deleción 22q11. Es importante señalar que los otros 14 pacientes estudiados mediante Array CGH a los que no se les detectó deleción 22q11, presentaron también hallazgos negativos en el estudio de MLPA para dicha deleción. Estos hallazgos en conjunto a la asesoría y evaluación de calidad prestada por El Instituto de Genética Médica y Molecular del Hospital Universitario La Paz, validan el protocolo operacional de MLPA (Anexo #1) diseñado para este estudio y aseguran la replicabilidad de los resultados obtenidos en otros escenarios.

Cabe mencionar que en los cuatro pacientes con diagnóstico de deleción 22q11, confirmado por Array CGH, este estudio mostro compromiso del gen TBX1 en todos los casos. También este estudio reveló en el paciente serial 04 presenta una ganancia concomitante en 8p23.3 de 796 Kbp, que no compromete el gen GATA4. Se razona que a pesar de que existen reportes de CHD asociadas a duplicaciones en 8p23, previamente discutidos en este trabajo (510, 511), la falta de compromiso de GATA4 y el fenotipo compatible con síndrome por deleción 22q11 hace

improbable que esta duplicación sea causal de la expresión clínica del paciente (Ver tabla 14) (513, 514).

En los casos serial 02, 06, y 24 se evidenció la presencia de ganancias en la región 14q32.3, lugar donde se encuentra el locus para el gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina. Diferentes alteraciones citogenéticas en esta región han sido asociadas con la presencia de linfomas, entre los que se incluyen: Linfoma no Hodgkins, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, linfoma de células de manto, linfoma de células grandes, linfoma linfoplasmocítico, mieloma múltiple, y leucemia (Ver tabla 14) (515).

Del mismo modo, diferentes mutaciones en este locus se han asociado con tumores de células germinales intracraneales, y particularmente la presencia de duplicaciones en esta región se relacionan con susceptibilidad familiar para neoplasias mieloproliferativas (516, 517). Sin embargo en la literatura y en las bases de datos revisadas, no se evidencia ninguna asociación entre alteraciones de la región 14q32.3 y la presencia de CHD. Esto indica que para los pacientes que presentaron de manera aislada ganancias en 14q32.3, la expresión fenotípica de TOF puede asociarse a la presencia de mutaciones en genes específicos asociados a la cardiogénesis, que no fueron estudiados en este proyecto, o por efecto de la influencia medioambiental durante su desarrollo embriológico.

Es importante mencionar que tomando en cuenta los resultados obtenidos por el Array CGH, en adición a los casos con delección 22q11, detectados mediante MLPA, se evidencia un aporte causal de las variantes de copia numérica de un 40% , superior a lo reportado en la literatura (10%), sin embargo se considera que dicho resultado se puede atribuir a las características inherentes del instituto clínico en donde se reclutaron los pacientes, por ser una institución de referencia para el manejo de CHD; al igual de una posible influencia del sesgo de prevalencia, debido a que la población que conforma la muestra estudiada está compuesta por aquellos pacientes que han sobrevivido a su condición patológica (363, 369, 370) .



**Tabla 14.** Variantes de copia numérica identificadas por hibridación genómica comparativa en pacientes con delección 22q11.

Serial	Hallazgos CGH arr[GRCh37]
3	22q11.1q11.23(16888899-25235311)x1-2
	14q32.33(106263206-106927569)x3
	20p12.3(8085389-8589571)x3
	22q11.21(18648855-21800471)x1
	2q32.1(184087706-184566974)x1
	14q11.2(22504863-22929410)x1
4	4p16.1(8049722-8468466)x3
	2q37.2(236407834-236850071)x3
	1p33(49232074-49770653)x1
	5p15.33(423851-1286146)x3
	Xq11.1q11.2(62879754-63337569)x1
	17q12(32026388-32682371)x1
	17q25.3(79973190-80422276)x3
	9q33.1(119745354-120299808)x1
	20q13.33(61854501-62482985)x3
	20q13.31q13.33(55747073-62913645)x2-3
	16q12.1q12.2(52078203-52664683)x1
	3p14.2(62634466-63107543)x1
	8q24.21(128220989-128664941)x1
	22q11.1q12.3(16888899-34291535)x1-2
	20q13.33(60183579-60634141)x3
	8p23.2(4389022-4874103)x3
	8q24.3(142079211-143895545)x3
	22q11.21(20280355-21927646)x1
	Xq21.33(96329960-96816107)x3
	10p15.3(325510-1424630)x3
	8p23.3p23.2(1597124-3261298)x3
	8p23.3(576208-1370782)x3
	7q36.3(158523372-158965077)x3
	5q33.2(152925469-153662029)x1
	8q24.13(122590948-123002129)x3

2q37.3(240117652-240955636)x3
Xq12(65454105-66170447)x1
16q12.2(55173604-55668533)x1
21q22.11(31593592-32011002)x3
8q11.1(47204071-47807237)x1
16q24.1(85185677-85712129)x3
21q21.1(21377944-22237121)x3
18q23(75697307-76420809)x3
4p15.33(13859365-14503255)x1
4q35.2(190188231-190796286)x3
Xp11.4(38773404-39381621)x1
20q12(37957394-38710444)x1
10q23.31(91619644-92031933)x1
5p15.33(2960266-3388058)x3
18q22.2q23(68475616-78013728)x2-3
12p13.1(13470200-13888754)x1
4q33q35.2(171120969-190957460)x2-3
6q27(169513850-170095328)x3
5p15.33(2126881-2782365)x3
5q33.3(157451303-158238647)x1
4q22.2q22.3(95063376-95713829)x3
5q23.2(125004031-125669251)x1
7p22.3(120260-1142815)x3
2p25.3(382899-2048317)x3
8q24.13(123363425-123768668)x1
10p15.2p15.1(3778112-4363062)x3
11p11.12(50298972-51462934)x1
1p21.3(98548839-98961692)x1
10q26.3(134155899-135203443)x3
20q13.33(60710278-61531155)x3
6q26(161333656-161924381)x3
10q26.3(131150989-131878260)x3
8q24.21(129134664-129660922)x1
14q32.33(106313855-106927569)x3
3p23(31041181-31446887)x1
10p15.3p15.2(2116123-3004486)x3

6q27(168355431-169050194)x3
9q34.3(138978513-139763903)x3
12q24.31(124817911-125259976)x3
4q34.3(178152132-178658354)x3
5p13.2(37010892-37547511)x3
2p22.3(32479152-32911333)x3
3q23(139350315-139965143)x1
15q13.1(28183309-29427625)x3
6q26(162160651-163334304)x3
Xq21.31q21.32(91634275-92269093)x3
Yp11.2(4904853-6109876)x1
Xp21.3(26974018-27693952)x3
Xp22.11(23635631-24202985)x3
1p36.33p36.32(2003054-3639200)x3
7q36.3(157423154-157868374)x3
20q12(40429439-41193534)x1
16p13.3(549826-1054247)x3
3q25.2(152755385-153254564)x3
2p11.2(86918565-88180843)x3
8p23.3p22(158048-16323329)x2-3
17q25.3(78710646-79263897)x3
8q13.1(67321205-67775641)x3
7p22.2(3896840-4309861)x3
3q26.2(169715094-170228362)x3
18q21.1(44725071-45237816)x1
18q12.3(42705274-43195956)x1
16p11.2(32872100-33863672)x3
4p16.1(7161792-7746657)x3
16p13.3(1129061-1722385)x3
2p22.2(37113577-37542798)x3
6q25.1q27(149731315-170914297)x2-3
3q26.32(176888745-177358563)x3
6q27(167765006-168223121)x3
4q35.1q35.2(186930536-187670171)x3
13q34(114191943-114929602)x3
1p36.33(1134091-1642090)x3

	13q34(113157583-113736170)x3
	22q11.21(18648855-19945523)x1
	9q34.2q34.3(137023631-138189865)x3
	3q23(142078575-142503339)x3
	4q35.2(188878384-189971340)x3
	16q24.2q24.3(88321782-89481006)x3
	10p11.21(36611047-37105589)x3
	11q22.1(98070134-98653719)x3
	21q21.2(24865072-25369055)x3
	Xq21.31(89775200-90554204)x3
	1p32.3p32.2(55985147-56820571)x1
	1p32.1(60583162-60994215)x1
	3q22.3(136780919-137254469)x1
	5p12q11.1(45861144-49556125)x1
	6p11.2q11.1(58472400-62206632)x1
	8q24.22(134925724-135438456)x1
	10q25.2(112922408-113876022)x1
	12p11.1q12(34662093-38385512)x1
	Xp11.21q11.1(58083166-62044757)x1
12	22q11.1q12.1(16888899-26254268)x1-2
	14q32.33(106251486-106712665)x3
	2q13(110498141-110980295)x3
	22q11.21(18636749-21800471)x1
31	22q11.1q12.3(16888899-33370145)x1-2
	2q12.3(108394015-109119564)x3
	22q11.21(18636749-21058888)x1

## 8. Conclusiones

En la muestra estudiada la causa etiológica más importante asociada a tetralogía de Fallot fue el síndrome por delección 22q11. Mediante la aplicación del protocolo metodológico propuesto, se logró determinar el diagnóstico etiológico en 51.4% (18 pacientes) de los pacientes.

En los pacientes diagnosticados se identificaron 4 casos (11.4%) de pacientes con trisomía 21 (Síndrome de Down); y 14 casos (40%) asociados a síndromes por microdelección o microduplicación génica, de los cuales 9 casos (25.7%) corresponden a síndrome por delección 22q11. Adicionalmente en 5 casos (14.28%) se identificaron microdelecciones o microduplicaciones en regiones previamente asociadas con fenotipo de tetralogía de Fallot (no sindrómica) (Ver Tabla 15.).

Los hallazgos evidenciados en los pacientes con ganancias en la región 9q34.3 sugieren un posible rol de una región crítica, que afecta genes adyacentes al gen RXRA, en la patogénesis de la tetralogía de Fallot. Además, sugieren la posibilidad de que ganancias en el NOTCH1 pudieran presentar, dentro de su espectro fenotípico, este tipo de cardiopatía. En este sentido, se propone que tanto la duplicación como la haploinsuficiencia podrían explicar la cardiopatía.

De igual manera, los hallazgos descritos en pacientes con ganancias en 1p36.3, y 8q24 insinúan que alteraciones en el gen PRDM16 podrían relacionarse con diferentes alteraciones cardiovasculares, incluyendo la tetralogía de Fallot; al igual que sugieren un rol importante del cromosoma 8 en la presencia de cardiopatías congénitas, sin embargo, este efecto se podría atribuir al compromiso en su brazo corto (8p).

En la población estudiada se evidencia un aporte causal de las variantes de copia numérica superior a lo reportado en la literatura (40%). Sin embargo, se considera que dicho resultado se puede atribuir a las características inherentes del instituto clínico en donde se reclutaron los pacientes, al igual de una posible influencia por un sesgo de incidencia - prevalencia.

La amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación y la hibridación genómica comparativa array, son herramientas indispensables para determinar un origen causal genético en los individuos con cardiopatías congénitas, especialmente tetralogía de Fallot, así como establecer un diagnóstico definitivo en individuos con fenotipos sindromáticos. La aplicación de estas técnicas en pacientes con hallazgos aislados de tetralogía de Fallot, o en asociación a la presencia de anomalías menores secundarias puede ayudar a determinar regiones génicas críticas asociadas al proceso de la cardiogénesis.

Se considera que, en las instituciones clínicas, particularmente en centros de referencia o de manejo de alta complejidad de cardiopatías congénitas, donde se atienden casos de tetralogía de Fallot, es imprescindible descartar la presencia de alteraciones de la dosis génica, especialmente el síndrome por delección 22q11.

Aunque en la muestra del presente estudio solo se incluyen pacientes originarios del Sur-occidente Colombiano, se considera que no es representativo de la población Colombiana debido a que todos los participantes son, o fueron atendidos en una institución de referencia para el manejo de cardiopatías congénitas.

Aunque los resultados de este estudio sugieren una contribución importante por parte de las variantes de copia numérica en la etiología de la tetralogía de Fallot, es necesario desarrollar nuevos proyectos que evalúen el rol de las mutaciones puntuales como causal etiológica de esta condición en la población Colombiana.

**Tabla 15.** Hallazgos causales de tetralogía de Fallot en la población estudiada.

Serial	Resultado asociado TOF	Síndrome/asociación
1	Pérdida 19p13,3	Síndrome por microdeleción 19p13
2	Negativo	-
3	Pérdida 22q11.21	Síndrome deleción 22q11 (Velocardiofacial / DiGeorge síndrome).
4	Pérdida 22q11.21	Síndrome deleción 22q11 (Velocardiofacial / DiGeorge síndrome).
5	Ganancia 9q34.3	Síndrome por duplicación 9q34.3
6	Negativo	-
7	Ganancia 9q34.3	Síndrome por duplicación 9q34.3
8	Pérdida 18p11.32	Síndrome por deleción 18p-
9	47,XY+21	Síndrome de Down
10	Ganancia 1p36.32	Región asociada a fenotipo de TOF
	Ganancia Xq21.33	
	Ganancia 8q24.3	
	Ganancia Xq21.31	
	Ganancia Xp21.1	
11	Ganancia 8q24.3	Región asociada a fenotipo de TOF
	Ganancia 1p36.32	
	Ganancia 16q24.3	
12	Pérdida 22q11.21	Síndrome deleción 22q11 (Velocardiofacial / DiGeorge síndrome).
13	Ganancia 9q34.3	Síndrome por duplicación 9q34.3
14	*	-
15	47,XY+21	Síndrome de Down
16	*	-



17	47,XX+21	Síndrome de Down
18	*	-
19	*	-
20	Ganancia 1p36.32	Región asociada a fenotipo de TOF
21	47,XX+21	Síndrome de Down
22	*	-
23	Ganancia 1p36.32	Región asociada a fenotipo de TOF
	Ganancia 16q24.3	
24	Negativo	-
25	Pérdida 22q11.21	Síndrome deleción 22q11 (Velocardiofacial / DiGeorge síndrome).
26	*	-
27	*	-
28	*	-
29	*	-
30	Pérdida 22q11.21	Síndrome deleción 22q11 (Velocardiofacial / DiGeorge síndrome).
31	Pérdida 22q11.21	Síndrome deleción 22q11 (Velocardiofacial / DiGeorge síndrome).
32	Ganancia 1p36.32	Región asociada a fenotipo de TOF
	Ganancia 8q24.3	
33	Pérdida 22q11.21	Síndrome deleción 22q11 (Velocardiofacial / DiGeorge síndrome).
34	Pérdida 22q11.21	Síndrome deleción 22q11 (Velocardiofacial / DiGeorge síndrome).
35	Pérdida 22q11.21	Síndrome deleción 22q11 (Velocardiofacial / DiGeorge síndrome).

\* Falla o muestra insuficiente para realización de Array CGH

## 9. Referencias

1. Hoffman J. Incidence of congenital heart disease: I. Postnatal incidence. *Pediatr cardiol.* 1995; 16: 103-13.
2. Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature* 2008; 451(7181): 943-8.
3. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Das SR, de Ferranti S, Després J-P, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Isasi CR, Jiménez MC, Judd SE, Kissela BM, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Magid DJ, McGuire DK, Mohler ER III, Moy CS, Muntner P, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Nichol G, Palaniappan L, Pandey DK, Reeves MJ, Rodriguez CJ, Rosamond W, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Woo D, Yeh RW, Turner MB; on behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2016; 133 (4):e38-e360.
4. Fahed AC, Gelb BD, Seidman JG, Seidman CE (2013) Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. *Circ Res* 112: 707–720doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.300853.
5. Nora JJ. Causes of congenital heart diseases: old and new modes, mechanisms, and models. *Am Heart J.* 1993; 125: 1409-19
6. Ferencz C, Neil CA, Boughman JA, Rubin JD, Brenner JI, Perry LW. Congenital cardiovascular malformations associated with chromosome abnormalities: an epidemiologic study. *J Pediatr* 1989; 114: 79-86
7. Pierpont ME, Basson CT, Benson DW, Jr, Gelb BD, Giglia TM, Goldmuntz E, McGee G, Sable CA, Srivastava D, Webb CL. Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation.* 2007;115:3015–3038. [PubMed]
8. Webb GD, Williams RG. Care of the adult with congenital heart disease: introduction. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 37: 1166
9. Lu X-Y, Phung MT, Shaw CA, Pham K, Neil SE, Patel A, Sahoo T, Bacino CA, Stankiewicz P, Kang S-HL, Lalani S, Chinault AC, Lupski JR, Cheung SW, Beaudet AL. Genomic imbalances in neonates with

- birth defects: High detection rates using chromosomal microarray analysis. *Pediatr* 2008; 122: 1310-8.
10. van der Bom T, Zomer AC, Zwinderman AH, Meijboom FJ, Bouma BJ, Mulder BJ. The changing epidemiology of congenital heart disease. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8:50–60
  11. Kuciene, R. & Dulskiene, v. Selected environmental risk factors and congenital heart defects. *Medicina (Kaunas)* 44, 827–832 (2008).
  12. Azhar M, Ware SM. Genetic and Developmental Basis of Cardiovascular Malformations. *Clin Perinatol*. 2016 Mar;43(1):39-53. doi: 10.1016/j.clp.2015.11.002.
  13. Chaix MA, Andelfinger G, Khairy P. Genetic testing in congenital heart disease: A clinical approach. *World J Cardiol*. 2016 Feb 26;8(2):180-91. doi: 10.4330/wjc.v8.i2.180.
  14. Landis BJ, Ware SM. The Current Landscape of Genetic Testing in Cardiovascular Malformations: Opportunities and Challenges. *Front Cardiovasc Med*. 2016 Jul 25;3:22. doi: 10.3389/fcvm.2016.00022. eCollection 2016.
  15. Chung IM, Rajakumar G. Genetics of Congenital Heart Defects: The NKX2-5 Gene, a Key Player. *Genes (Basel)*. 2016 Jan 23;7(2). pii: E6. doi: 10.3390/genes7020006.
  16. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Blesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, aggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet*. 2010;86:749-64
  17. Pradat P, Francannet C, Harris JA, et al. The epidemiology of cardiovascular defects, part I: a study based on data from three large registries of congenital malformations. *Pediatr Cardiol* 2003; 24: 195–221.
  18. Pedersen LM, Pedersen TA, Ravn HB, Hjortdal VE. Outcomes of pregnancy in women with tetralogy of Fallot. *Cardiol Young* 2008; 18: 423-9.
  19. Pachajoa H, Ariza Y, Isaza C, Méndez F. Defectos congénitos mayores en un hospital de tercer nivel en Cali, Colombia 2004-2008. *Rev. salud pública [serial on the Internet]*. 2011 Feb [cited 2014 June 10]; 13(1): 152-162.
  20. Anderson R, Winberg P. The clinical anatomy of tetralogy of Fallot. *Cardiol Young* 2005; 15 (suppl 1): 38-47.
  21. García-Robles R., Ayala-Ramírez P. A., Villegas V. E., Salazar M., Bernal J., Núñez F., Caicedo V., Pachón S., Ramírez S., Bermúdez M. Estudio del polimorfismo MTHFR C677T en recién nacidos con

- cardiopatías congénitas aisladas, en una población colombiana Univ Méd Bogotá Colombia 2011; 52(3) : 269-276
22. Tennant, P.W., Pearce, M.S., Bythell, M. & Rankin, J. 20-year survival of children born with congenital anomalies: a population-based study. *Lancet* 375, 649–656 (2010).
  23. Cordell HJ, Bentham J, Topf A, Zelenika D, Heath S, et al. (2013) Genome-wide association study of multiple congenital heart disease phenotypes identifies a susceptibility locus for atrial septal defect at chromosome 4p16. *Nature Genetics* 45: 822–824 [PMC free article] [PubMed]
  24. Soemedi, R. et al. Contribution of global rare copy-number variants to the risk of sporadic congenital heart disease. *Am. J. Hum. Genet.* 91, 489–501 (2012).
  25. Moorman AFM, Christoffels VM 2003 Cardiac chamber formation: development, genes and evolution. *Physiol Rev* 83:1223–1267
  26. Pachajoa H, Villota VA, Cruz LM, Ariza Y. Prevalencia de defectos congénitos diagnosticados en el momento del nacimiento en dos hospitales de diferente nivel de complejidad, Cali, Colombia, 2012-2013. *Biomédica*. 2015; 35( 2 ): 227-234.
  27. Madrid A, Restrepo JP. Cardiopatías congénitas. *Revista Gastrohnap* 2013. Vol 15. No 1. S1. Enero-abril:S56-S72.
  28. Dolk H, Loane M, Garne E, for the European Surveillance of Congenital Anomalies (EUROCAT) Working Group. Congenital heart defects in Europe: prevalence and perinatal mortality, 2000 to 2005. *Circulation* 2011;123:841–9.
  29. Baldacci S, Pierini A, Santoro M, Spadoni I, Bianchi F. Prevalence, mortality and lethality of congenital heart defects from the Tuscan Registry (Tuscany Region, Central Italy), 1992-2009. *Epidemiol Prev.* 2015 Jan-Feb;39(1):36-44.
  30. Gilboa SM, Salemi JL, Nembhard WN, Fixler DE, Correa A. Mortality resulting from congenital heart disease among children and adults in the United States, 1999 to 2006. *Circulation*. 2010;122(22):2254-63.
  31. Burch M, Dedieu N. Almanac 2012: congenital heart disease. The national society journals present selected research that has driven recent advances in clinical cardiology. *Rev Port Cardiol.* 2013 Mar;32(3):269-77. doi: 10.1016/j.repc.2012.10.008. Epub 2013 Mar 1.
  32. Van der Linde D, Konings EE, Slager MA, et al. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:2241e7.
  33. Ortiz MR, Flores G, Cardiel LE, Luna C. Frecuencia de malformaciones congénitas en el área de neonatología del Hospital General de México. *Rev Mex Pediatr* 2003; 70: 12-131.

34. Castilla EE, Orioli IM. ECLAMC: the LatinAmerican collaborative study of congenital malformations. *Community Genet* 2004; 7: 76-94.
35. Pinto Jr VC. Avaliação da política nacional de atenção cardiovascular de alta complexidade com foco na cirurgia cardiovascular pediátrica [Dissertação de mestrado]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2010.
36. Pinto Jr VC, Branco Klébia Magalhães PC, Cavalcante RC, Carvalho Junior W, Lima José RC, Freitas SM et al . Epidemiology of congenital heart disease in Brazil. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2015 Apr; 30( 2 ): 219-224.
37. Caneo LF, Jatene MB, Yatsuda N, Gomes WJ. Uma reflexão sobre o desempenho da cirurgia cardíaca pediátrica no Estado de São Paulo. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2012;27(3):457-62.
38. Baltaxe E, Zarante I. Prevalencia de malformaciones cardíacas congénitas en 44,985 nacimientos en Colombia§. *Arch. Cardiol. Méx.* [revista en la Internet]. 2006 Sep [citado 2016 Ago 29] ; 76( 3 ): 263-268. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-99402006000300003&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-99402006000300003&lng=es).
39. Instituto Nacional de Salud. Informe Final Anomalías Congénitas 2013. Fecha de consulta: 29 de Agosto de 2016. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiolgico/ANOMALIAS%20CONGENITAS%202013.pdf>
40. Pachajoa H, Ariza Y, Isaza C, Méndez F. Defectos congénitos mayores en un hospital de tercer nivel en Cali, Colombia 2004-2008. *Rev. salud pública* [Internet]. 2011 Feb [cited 2016 Aug 31] ; 13( 1 ): 152-162. Available from: [http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0124-00642011000100013&lng=en](http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-00642011000100013&lng=en). <http://dx.doi.org/10.1590/S0124-00642011000100013>.
41. Isaza C, Martina D, Estupiñán J, Stark C, Rey H. Prevalencia de anomalías congénitas diagnosticadas en las primeras 24 horas de vida. *Colombia Médica*. 1989; 20:156-9
42. Srivastava D. Genetic regulation of cardiogenesis and congenital heart disease. *Annu. Rev. Pathol*. 2006, 1, 199–213.
43. Srivastava, D. & Olson, E.N. (2000) A genetic blueprint for cardiac development. *Nature* 407, 221–226.
44. Lian X, Xu J, Li J, Chien KR. Next-Generation Models of Human Cardiogenesis via Genome Editing. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4:a013920.

45. Sadler TW. Cardiovascular system. En: Taylor C, Pecarich L, EDITORS. Langman's Medical Embryology 13<sup>th</sup> edition. Philadelphia : Wolters Kluwer Health; 2015. P. 175-217.
46. Firulli, A.B., Thattaliyath, B.D., 2002. Transcription factors in cardiogenesis: The combinations that may unlock the mysteries of the heart. *Inter. Rev. Cytol.* 214, 1–62.
47. Lopez-Sanchez, C. & Garcia-Martinez, V., 2011. Molecular determinants of cardiac specification. *Cardiovasc Res* 91, 185–195.
48. Abu-Issa, R. & Kirby, M.L., 2008, Patterning of the heart field in the chick. *Dev Biol* 319, 223–233.
49. Rana MS, Christoffels VM, Moorman AF. A molecular and genetic outline of cardiac morphogenesis. *Acta Physiol (Oxf)* (2013) 207(4):588–615. doi:10.1111/apha.12061.
50. Arnold, S.J., Huang, G.J., Cheung, A.F., Era, T., Nishikawa, S., Bikoff, E.K., Molnar, Z., Robertson, E.J. & Groszer, M. (2008) The T-box transcription factor Eomes/Tbr2 regulates neurogenesis in the cortical subventricular zone. *Genes Dev* 22, 2479–2484.
51. Costello, I., Pimeisl, I.M., Drager, S., Bikoff, E.K., Robertson, E.J. & Arnold, S.J. (2011) The T-box transcription factor Eomesodermin acts upstream of Mesp1 to specify cardiac mesoderm during mouse gastrulation. *Nat Cell Biol* 13, 1084–1091.
52. Bondue, A. & Blanpain, C. (2010) Mesp1: a key regulator of cardiovascular lineage commitment. *Circ Res* 107, 1414–1427.
53. Harvey, RP. Patterning the vertebrate heart. *Nat Rev Genet.* 2002; 3, 544–556.
54. Vincentz JW, Barnes RM, Firulli BA, Conway SJ, Firulli AB. Cooperative interaction of Nkx2.5 and Mef2c transcription factors during heart development. *Dev Dyn.* 2008;237(12):3809–3819.
55. Schoenwolf, G.C. & Garcia-Martinez, V. (1995) Primitivestreak origin and state of commitment of cells of the cardiovascular system in avian and mammalian embryos. *Cell Mol Biol Res* 41, 233–240.
56. Tam, P.P., Parameswaran, M., Kinder, S.J. & Weinberger, R. P., 1997. The allocation of epiblast cells to the embryonic heart and other mesodermal lineages: the role of ingression and tissue movement during gastrulation. *Development* 124, 1631–1642.
57. Paige SL, Plonowska K, Xu A, Wu SM. Molecular regulation of cardiomyocyte differentiation. *Circ Res.* 2015;116(2):341–53. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.302752

58. Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet.* 2005; 6:826–835.
59. Waldo KL, Kumiski DH, Wallis KT, Stadt HA, Hutson MR, Platt DH, Kirby ML. Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development.* 2001; 128:3179–3188.
60. Mjaatvedt CH, Nakaoka T, Moreno-Rodriguez R, Norris RA, Kern MJ, Eisenberg CA, Turner D, Markwald RR. The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Dev Biol.* 2001; 238:97–109.
61. Waldo KL, Hutson MR, Ward CC, Zdanowicz M, Stadt HA, Kumiski D, Abu-Issa R, Kirby ML. Secondary heart field contributes myocardium and smooth muscle to the arterial pole of the developing heart. *Dev Biol.* 2005; 281:78–90.
62. Zaffran S, Kelly RG, Meilhac SM, Buckingham ME, Brown NA. Right ventricular myocardium derives from the anterior heart field. *Circ Res.* 2004; 95:261–268.
63. Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, Evans S. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell.* 2003; 5:877–889.
64. Verzi MP, McCulley DJ, De Val S, Dodou E, Black BL. The right ventricle, outflow tract, and ventricular septum comprise a restricted expression domain within the secondary/anterior heart field. *Dev Biol.* 2005; 287:134–145.
65. Kelly RG. The second heart field. *Curr Top Dev Biol.* 2012; 100:33–65.
66. Rochais F, Mesbah K, Kelly RG. Signaling pathways controlling second heart field development. *Circ Res.* 2009; 104:933–942.
67. Takeuchi JK, Ohgi M, Koshiba-Takeuchi K, Shiratori H, Sakaki I, Ogura K, Saijoh Y, Ogura T. Tbx5 specifies the left/right ventricles and ventricular septum position during cardiogenesis. *Development.* 2003; 130:5953–5964.
68. Stanley EG, Biben C, Elefanty A, Barnett L, Koentgen F, Robb L, Harvey RP. Efficient cre-mediated deletion in cardiac progenitor cells conferred by a 3'utr-ires-cre allele of the homeobox gene *nkx2-5*. *Int J Dev Biol.* 2002; 46:431–439.
69. Liang X, Wang G, Lin L, Lowe J, Zhang Q, Bu L, Chen Y, Chen J, Sun Y, Evans SM. Hcn4 dynamically marks the first heart field and

- conduction system precursors. *Circ Res.* 2013; 113:399–407. [PubMed: 23743334]
70. Später D, Abramczuk MK, Buac K, Zangi L, Stachel MW, Clarke J, Sahara M, Ludwig A, Chien KR. A *hcn4*<sup>+</sup> cardiomyogenic progenitor derived from the first heart field and human pluripotent stem cells. *Nat Cell Biol.* 2013; 15:1098–1106.
  71. Moretti A, Caron L, Nakano A, Lam JT, Bernshausen A, Chen Y, Qyang Y, Bu L, Sasaki M, Martin-Puig S, Sun Y, Evans SM, Laugwitz KL, Chien KR. Multipotent embryonic *isl1*<sup>+</sup> progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell.* 2006; 127:1151–1165.
  72. Rana MS, Theveniau-Ruissy M, De Bono C, Mesbah K, Francou A, Rammah M, Dominguez JN, Roux M, Laforest B, Anderson RH, Mohun TJ, Zaffran S, Christoffels VM, Kelly RG. *Tbx1* coordinates addition of posterior second heart field progenitor cells to the arterial and venous poles of the heart. *Circ Res.* 2014.
  73. Vincent SD, Mayeuf-Louchart A, Watanabe Y, Brzezinski JA, Miyagawa-Tomita S, Kelly RG, Buckingham M. *Prdm1* functions in the mesoderm of the second heart field, where it interacts genetically with *tbx1*, during outflow tract morphogenesis in the mouse embryo. *Hum Mol Genet.* 2014
  74. Ma HY, Xu J, Eng D, Gross MK, Kiousi C. *Pitx2*-mediated cardiac outflow tract remodeling. *Dev Dyn.* 2013; 242:456–468.
  75. Zaffran S, Kelly RG. New developments in the second heart field. *Differentiation.* 2012; 84:17–24.
  76. Dyer LA, Kirby ML. Sonic hedgehog maintains proliferation in secondary heart field progenitors and is required for normal arterial pole formation. *Dev Biol.* 2009; 330:305–317.
  77. Yamagishi H, Maeda J, Hu T, McAnally J, Conway SJ, Kume T, Meyers EN, Yamagishi C, Srivastava D. *Tbx1* is regulated by tissue-specific forkhead proteins through a common sonic hedgehog-responsive enhancer. *Genes Dev.* 2003; 17:269–281.
  78. Seo S, Kume T. Forkhead transcription factors, *foxc1* and *foxc2*, are required for the morphogenesis of the cardiac outflow tract. *Dev Biol.* 2006; 296:421–436.
  79. Park EJ, Ogden LA, Talbot A, Evans S, Cai CL, Black BL, Frank DU, Moon AM. Required, tissue-specific roles for *fgf8* in outflow tract formation and remodeling. *Development.* 2006; 133:2419–2433. [PubMed: 16720879]



80. Watanabe Y, Zaffran S, Kuroiwa A, Higuchi H, Ogura T, Harvey RP, Kelly RG, Buckingham M. Fibroblast growth factor 10 gene regulation in the second heart field by *tbx1*, *nkx2-5*, and *islet1* reveals a genetic switch for down-regulation in the myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109:18273–18280.
81. Aggarwal VS, Liao J, Bondarev A, Schimmang T, Lewandoski M, Locker J, Shanske A, Campione M, Morrow BE. Dissection of *tbx1* and *fgf* interactions in mouse models of 22q11ds suggests functional redundancy. *Hum Mol Genet*. 2006; 15:3219–3228.
82. Pane LS, Zhang Z, Ferrentino R, Huynh T, Cutillo L, Baldini A. *Tbx1* is a negative modulator of *mef2c*. *Hum Mol Genet*. 2012; 21:2485–2496.
83. Chen L, Fulcoli FG, Tang S, Baldini A. *Tbx1* regulates proliferation and differentiation of multipotent heart progenitors. *Circ Res*. 2009; 105:842–851.
84. Liao, J., Aggarwal, V.S., Nowotschin, S., Bondarev, A., Lipner, S. & Morrow, B.E. (2008) Identification of downstream genetic pathways of *Tbx1* in the second heart field. *Dev Biol* 316, 524–537.
85. Theveniau-Ruissy, M., Dandonneau, M., Mesbah, K., Ghez, O., Mattei, M.G., Miquerol, L. & Kelly, R.G. (2008) The del22q11.2 candidate gene *Tbx1* controls regional outflow tract identity and coronary artery patterning. *Circ Res* 103, 142–148.
86. Bu L, Jiang X, Martin-Puig S, Caron L, Zhu S, Shao Y, Roberts DJ, Huang PL, Domian IJ, Chien KR. Human *isl1* heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. *Nature*. 2009; 460:113–117.
87. Lin L, Cui L, Zhou W, Dufort D, Zhang X, Cai CL, Bu L, Yang L, Martin J, Kemler R, Rosenfeld MG, Chen J, Evans SM. Beta-catenin directly regulates *islet1* expression in cardiovascular progenitors and is required for multiple aspects of cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:9313–9318.
88. Prall, O.W., Menon, M.K., Solloway, M.J., Watanabe, Y., Zaffran, S., Bajolle, F., Biben, C., McBride, J.J., Robertson, B.R., Chaulet, H. et al. , et al. (2007) An *Nk2-5/ Bmp2/Smad1* negative feedback loop controls heart progenitor specification and proliferation. *Cell* 128, 947–959.
89. Kirby ML, Hutson MR. Factors controlling cardiac neural crest cell migration. *Cell Adh Migr*. 2010; 4

90. Hutson MR, Kirby ML. Model systems for the study of heart development and disease. Cardiac neural crest and conotruncal malformations. *Semin Cell Dev Biol.* 2007; 18:101–110.
91. Arima Y, Miyagawa-Tomita S, Maeda K, Asai R, Seya D, Minoux M, Rijli FM, Nishiyama K, Kim KS, Uchijima Y, Ogawa H, Kurihara Y, Kurihara H. Preotic neural crest cells contribute to coronary artery smooth muscle involving endothelin signalling. *Nat Commun.* 2012; 3:1267.
92. Escot S, Blavet C, Härtle S, Duband JL, Fournier-Thibault C. Misregulation of sdf1-cxcr4 signaling impairs early cardiac neural crest cell migration leading to conotruncal defects. *Circ Res.* 2013; 113:505–516.
93. Holler KL, Hendershot TJ, Troy SE, Vincentz JW, Firulli AB, Howard MJ. Targeted deletion of hand2 in cardiac neural crest-derived cells influences cardiac gene expression and outflow tract development. *Dev Biol.* 2010; 341:291–304.
94. Farrell MJ, Burch JL, Wallis K, Rowley L, Kumiski D, Stadt H, Godt RE, Creazzo TL, Kirby ML. Fgf-8 in the ventral pharynx alters development of myocardial calcium transients after neural crest ablation. *J Clin Invest.* 2001; 107:1509–1517.
95. High FA, Jain R, Stoller JZ, Antonucci NB, Lu MM, Loomes KM, Kaestner KH, Pear WS, Epstein JA. Murine jagged1/notch signaling in the second heart field orchestrates fgf8 expression and tissue-tissue interactions during outflow tract development. *J Clin Invest.* 2009; 119:1986–1996.
96. de la Pompa JL, Epstein JA. Coordinating tissue interactions: Notch signaling in cardiac development and disease. *Dev Cell.* 2012; 22:244–254.
97. Yang JT, Rayburn H, Hynes RO. Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development.* 1995; 121:549–560. 66.
98. Kwee L, Baldwin HS, Shen HM, Stewart CL, Buck C, Buck CA, Labow MA. Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (vcam-1) deficient mice. *Development.* 1995; 121:489–503.
99. del Monte G, Casanova JC, Guadix JA, MacGrogan D, Burch JB, Pérez-Pomares JM, de la Pompa JL. Differential notch signaling in the epicardium is required for cardiac inflow development and coronary vessel morphogenesis. *Circ Res.* 2011; 108:824–836.

100. Olivey HE, Compton LA, Barnett JV. Coronary vessel development: The epicardium delivers. *Trends Cardiovasc Med*. 2004; 14:247–251.
101. Red-Horse K, Ueno H, Weissman IL, Krasnow MA. Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature*. 2010; 464:549–553.
102. Katz TC, Singh MK, Degenhardt K, Rivera-Feliciano J, Johnson RL, Epstein JA, Tabin CJ. Distinct compartments of the proepicardial organ give rise to coronary vascular endothelial cells. *Dev Cell*. 2012; 22:639–650.
103. Sizarov, A., Ya, J., de Boer, B.A., Lamers, W.H., Christoffels, V.M. & Moorman, A.F. (2011) Formation of the building plan of the human heart: morphogenesis, growth, and differentiation. *Circulation* 123, 1125–1135.
104. Varner, V.D. & Taber, L.A. (2012) Not just inductive: a crucial mechanical role for the endoderm during heart tube assembly. *Development* 139, 1680–1690.
105. Viragh, S. & Challice, C.E. (1973) Origin and differentiation of cardiac muscle cells in the mouse. *J Ultrastruct Res* 42,1–24.
106. Arguello, C., de la Cruz, M.V. & Gomez, C.S. (1975) Experimental study of the formation of the heart tube in the chick embryo. *J Embryol Exp Morphol* 33, 1–11.
107. de la Cruz, M.V., Sanchez Gomez, C., Arteaga, M.M. & Arguello, C. (1977) Experimental study of the development of the truncus and the conus in the chick embryo. *J Anat* 123, 661–686.
108. Meilhac, S.M., Kelly, R.G., Rocancourt, D., Eloy-Trinquet, S., Nicolas, J.F. & Buckingham, M.E. (2003) A retrospective clonal analysis of the myocardium reveals two phases of clonal growth in the developing mouse heart. *Development* 130, 3877–3889.
109. Kelly, R.G., Brown, N.A. & Buckingham, M.E. (2001) The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell* 1, 435–440.
110. Cui, C., Cheuvront, T.J., Lansford, R.D., Moreno-Rodriguez, R.A., Schultheiss, T.M. & Rongish, B.J. (2009) Dynamic positional fate map of the primary heart-forming region. *Dev Biol* 332, 212–222.
111. Moorman, A.F., Christoffels, V.M., Anderson, R.H. & van den Hoff, M.J. (2007) The heart-forming fields: one or multiple? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362, 1257–1265.

112. Markwald, R. R. in *Developmental Mechanisms of Heart Disease* (eds Clark, E. B., Markwald, R. R. & Takao, A.) 3–27 (Futura Publishing Co., Armonk, New York, 1995).
113. Bremer JL. 1928. Part I. An interpretation of the development of the heart. *Am J Anat* 42:307–369.
114. Grant RP. 1964. The morphogenesis of corrected transposition and other anomalies of cardiac polarity. *Circulation* 29:71–83.
115. Mohun TJ, Leong LM, Weninger WJ, Sparrow DB. 2000. The morphology of heart development in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 218:74–88.
116. Männer J. 2004. On rotation, torsion, lateralization and handedness of the embryonic heart loop: New insights from a simulation model for the heart loop of chick embryos. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 278:481–492.
117. Männer J. 2006b. Ontogenetic development of the helical heart: Concepts and facts. *Eur J Cardiothorac Surg* 29 (Suppl 1):S69–S74.
118. Patten BM. 1922. The formation of the cardiac loop in the chick. *Am J Anat* 30:373–397.
119. Männer J. 2000. Cardiac looping in the chick embryo: A morphological review with special reference to terminological and biomechanical aspects of the looping process. *Anat Rec* 259:248–262.
120. Männer J. The anatomy of cardiac looping: a step towards the understanding of the morphogenesis of several forms of congenital cardiac malformations. *Clin. Anat.* 2009;22:21–35
121. Dyer, L.A. & Kirby, M.L. (2009) The role of secondary heart field in cardiac development. *Dev Biol* 336, 137–144.
122. Sizarov, A., Ya, J., de Boer, B.A., Lamers, W.H., Christoffels V.M. & Moorman, A.F. (2011) Formation of the building plan of the human heart: morphogenesis, growth, and differentiation. *Circulation* 123, 1125–1135.
123. Hensen, V. (1876) Beobachtungen über die Befruchtung und Entwicklung des Kaninchens und Meerschweinchens. *Z Anat Entwicklungsgesch.* 1, 353–423.
124. Hirokawa, N., Tanaka, Y., Okada, Y. & Takeda, S. 2006. Nodal Flow and the Generation of Left-Right Asymmetry. *Cell*, 125, 33–45.
125. Shiratori, H., Sakuma, R., Watanabe, M., Hashiguchi, H., Mochida, K., Sakai, Y., Nishino, J., Saijoh, Y., Whitman, M., and Hamada, H. (2001). Two-step regulation of left-right asymmetric expression of

- Pitx2: initiation by nodal signaling and maintenance by Nkx2. *Mol Cell* 7, 137-49.
126. Saijoh, Y., Oki, S., Ohishi, S., and Hamada, H. (2003). Left-right patterning of the mouse lateral plate requires nodal produced in the node. *Dev Biol* 256, 160-72.
  127. Meno, C., Gritsman, K., Ohishi, S., Ohfuji, Y., Heckscher, E., Mochida, K., Shimono, A., Kondoh, H., Talbot, W.S., Robertson, E.J., Schier, A.F., and Hamada, H. (1999). Mouse Lefty2 and zebrafish antivin are feedback inhibitors of nodal signaling during vertebrate gastrulation. *Mol Cell* 4, 287-98.
  128. Meno, C., Shimono, A., Saijoh, Y., Yashiro, K., Mochida, K., Ohishi, S., Noji, S., Kondoh, H., and Hamada, H. (1998). lefty-1 is required for left-right determination as a regulator of lefty-2 and nodal. *Cell* 94, 287-97.
  129. Yoshioka, H., Meno, C., Koshiba, K., Sugihara, M., Itoh, H., Ishimaru, Y., Inoue, T., Ohuchi, H., Semina, E.V., Murray, J.C., Hamada, H., and Noji, S. (1998). Pitx2, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell* 94, 299-305.
  130. Boorman, C.J. and Shimeld, S.M. (2002). Cloning and expression of a Pitx homeobox gene from the lamprey, a jawless vertebrate. *Dev Genes Evol* 212, 349-53.
  131. Boorman, C.J. and Shimeld, S.M. (2002). The evolution of left-right asymmetry in chordates. *Bioessays* 24, 1004-11.
  132. Campione, M., Steinbeisser, H., Schweickert, A., Deissler, K., van Bebber, F., Lowe, L.A., Nowotschin, S., Viebahn, C., Haffter, P., Kuehn, M.R., and Blum, M. (1999). The homeobox gene Pitx2: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development* 126, 1225-34.
  133. Campione, M., Ros, M.A., Icardo, J.M., Piedra, E., Christoffels, V.M., Schweickert, A., Blum, M., Franco, D., and Moorman, A.F. (2001). Pitx2 expression defines a left cardiac lineage of cells: evidence for atrial and ventricular molecular isomerism in the iv/iv mice. *Dev Biol* 231, 252-64.
  134. European society of cardiology [Internet]. Cardiac laterality the role of the homeobox transcription factor Pitx2 in cardiogenesis; 1 ene 2009; [citado 22 feb 2017]. Disponible: <https://www.escardio.org/Working-groups/Working-Group-on-Development,-Anatomy-and-Pathology/Publications/Cardiac-laterality#>

135. Nonaka, S., Shiratori, H., Saijoh, Y., and Hamada, H. (2002). Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* 418, 96-9.
136. Soufan AT, van den Berg G, Ruijter JM, de Boer PA, van den Hoff MJ, Moorman AF. Regionalized sequence of myocardial cell growth and proliferation characterizes early chamber formation. *Circ Res.* 2006; 99:545–552.
137. Lin YF, Swinburne I, Yelon D. Multiple influences of blood flow on cardiomyocyte hypertrophy in the embryonic zebrafish heart. *Dev Biol.* 2012; 362:242–253.
138. Dietrich AC, Lombardo VA, Abdelilah-Seyfried S. Blood flow and bmp signaling control endocardial chamber morphogenesis. *Dev Cell.* 2014; 30:367–377.
139. Auman HJ, Coleman H, Riley HE, Olale F, Tsai HJ, Yelon D. Functional modulation of cardiac form through regionally confined cell shape changes. *PLoS Biol.* 2007; 5:e53.
140. Christoffels VM, Smits GJ, Kispert A, Moorman AF. Development of the pacemaker tissues of the heart. *Circ Res.* 2010; 106:240–254.
141. Hoogaars WM, Barnett P, Moorman AF, Christoffels VM. T-box factors determine cardiac design. *Cell Mol Life Sci.* 2007a; 64:646–660.
142. Moskowitz IP, Pizard A, Patel VV, Bruneau BG, Kim JB, Kupershmidt S, Roden D, Berul CI, Seidman CE, Seidman JG. The t-box transcription factor *tbx5* is required for the patterning and maturation of the murine cardiac conduction system. *Development.* 2004; 131:4107–4116.
143. Hatcher CJ, Basson CT. Specification of the cardiac conduction system by transcription factors. *Circ Res.* 2009; 105:620–630.
144. Christoffels VM, Hoogaars WM, Tessari A, Clout DE, Moorman AF, Campione M. T-box transcription factor *tbx2* represses differentiation and formation of the cardiac chambers. *Dev Dyn.* 2004; 229:763–770.
145. Singh R, Hoogaars WM, Barnett P, Grieskamp T, Rana MS, Buermans H, Farin HF, Petry M, Heallen T, Martin JF, Moorman AF, 't Hoen PA, Kispert A, Christoffels VM. *Tbx2* and *tbx3* induce atrioventricular myocardial development and endocardial cushion formation. *Cell Mol Life Sci.* 2012; 69:1377–1389.
146. Mommersteeg MT, Hoogaars WM, Prall OW, de Gier-de Vries C, Wiese C, Clout DE, Papaioannou VE, Brown NA, Harvey RP,

- Moorman AF, Christoffels VM. Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circ Res*. 2007; 100:354–362.
147. Liberatore CM, Searcy-Schrick RD, Yutzey KE. Ventricular expression of *tbx5* inhibits normal heart chamber development. *Dev Biol*. 2000; 223:169–180.
  148. Habets PE, Moorman AF, Clout DE, van Roon MA, Lingbeek M, van Lohuizen M, Campione M, Christoffels VM. Cooperative action of *tbx2* and *nkx2.5* inhibits *anf* expression in the atrioventricular canal: Implications for cardiac chamber formation. *Genes Dev*. 2002; 16:1234–1246.
  149. Small EM, Krieg PA. Molecular regulation of cardiac chamber-specific gene expression. *Trends Cardiovasc Med*. 2004; 14:13–18.
  150. Bao ZZ, Bruneau BG, Seidman JG, Seidman CE, Cepko CL. Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by *irx4*. *Science*. 1999; 283:1161–1164.
  151. Bruneau BG, Logan M, Davis N, Levi T, Tabin CJ, Seidman JG, Seidman CE. Chamber-specific cardiac expression of *tbx5* and heart defects in holt-oram syndrome. *Dev Biol*. 1999; 211:100–108.
  152. Thomas T, Yamagishi H, Overbeek PA, Olson EN, Srivastava D. The bhlh factors, *dhand* and *ehand*, specify pulmonary and systemic cardiac ventricles independent of left-right sidedness. *Dev Biol*. 1998; 196:228–236.
  153. Wang J, Klysik E, Sood S, Johnson RL, Wehrens XH, Martin JF. *Pitx2* prevents susceptibility to atrial arrhythmias by inhibiting left-sided pacemaker specification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107:9753–9758.
  154. van den Berg, G. & Moorman, A.F. (2009) Concepts of cardiac development in retrospect. *Pediatr Cardiol* 30, 580–587.
  155. de Boer, B.A., van den Berg, G., de Boer, P.A., Moorman, A. F. & Ruijter, J.M. (2012) Growth of the developing mouse heart: an interactive qualitative and quantitative 3D atlas. *Dev Biol* 368, 203–213.
  156. Jensen, B., Boukens, B.J., Postma, A.V., Gunst, Q.D., van den Hoff, M.J., Moorman, A.F., Wang, T. & Christoffels, V.M. (2012) Identifying the evolutionary building blocks of the cardiac conduction system. *PLoS ONE* 7, e44231.
  157. Kim J-S, Virágh S, Moorman AFM, et al. Development of the myocardium of the atrioventricular canal and the vestibular spine in the human heart. *Circ Res* 2001;88:395–402

158. Davis CL. Development of the human heart from its first appearance to the stage found in embryos of twenty paired somites. *Contrib Embryol* 1927;19:245–84.
159. Anderson RH, Becker AE. Cardiac anatomy. An integrated text and colour atlas. London: Gower Medical Publishing, 1980:10.12–10.19. c
160. Lamers WH, Moorman AFM. Cardiac septation. A late contribution of the embryonic primary myocardium to heart morphogenesis. *Circ Res* 2002;91:93–103.
161. Lamers WH, Wessels A, Verbeek FJ, et al. New findings concerning ventricular septation in the human heart. Implications for maldevelopment. *Circulation* 1992;86:1194–205
162. Houweling, A.C., Somi, S., Van Den Hoff, M.J., Moorman, A.F. & Christoffels, V.M. (2002) Developmental pattern of ANF gene expression reveals a strict localization of cardiac chamber formation in chicken. *Anat Rec* 266, 93–102.
163. He, A., Kong, S.W., Ma, Q. & Pu, W.T. (2011) Co-occupancy by multiple cardiac transcription factors identifies transcriptional enhancers active in heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 5632–5637.
164. van den Boogaard, M., Wong, L. Y., Tessadori, F., Bakker, M. L., Dreizehnter, L. K., Wakker, V., Bezzina, C. R., ten Hoen, P. A., Bakkers, J., Barnett, P. & Christoffels, V. M. 2012. Genetic variation in T-box binding element function- ally affects SCN5A/SCN10A enhancer. *J Clin Invest*, 122, 2519–2530.
165. Lyons, I., Parsons, L.M., Hartley, L., Li, R., Andrews, J.E., Robb, L. & Harvey, R.P. (1995) Myogenic and morphoge- netic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nk2–5. *Genes Dev* 9, 1654–1666.
166. Tanaka, M., Chen, Z., Bartunkova, S., Yamasaki, N. & Izumo, S. (1999) The cardiac homeobox gene Csx/Nkx2.5 lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development. *Development* 126, 1269–1280.
167. Bruneau, B.G., Logan, M., Davis, N., Levi, T., Tabin, C.J., Seidman, J.G. & Seidman, C.E. (1999) Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome. *Dev Biol* 211, 100–108.
168. Bruneau, B.G., Nemer, G., Schmitt, J.P., Charron, F., Robita- ille, L., Caron, S., Conner, D.A., Gessler, M., Nemer, M., Seidman, C.E. & Seidman, J.G. (2001) A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcrip- tion factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell* 106, 709–721.
169. Singh, M.K., Christoffels, V.M., Dias, J.M., Trowe, M.O., Petry, M., Schuster-Gossler, K., Burger, A., Ericson, J. & Kispert, A. (2005) Tbx20 is essential for cardiac chamber differentiation and repression of Tbx2. *Development* 132, 2697–2707.



170. Stennard, F.A., Costa, M.W., Lai, D., Biben, C., Furtado, M. B., Solloway, M.J., McCulley, D.J., Leimena, C., Preis, J.I., Dunwoodie, S.L., Elliott, D.E., Prall, O.W., Black, B.L., Fatkin, D. & Harvey, R.P. (2005) Murine T-box transcription factor Tbx20 acts as a repressor during heart development, and is essential for adult heart integrity, function and adaptation. *Development* 132, 2451–2462.
171. Takeuchi, J.K., Mileikowskaia, M., Koshiba-Takeuchi, K., Heidt, A.B., Mori, A.D., Arruda, E.P., Gertsenstein, M., Georges, R., Davidson, L., Mo, R. et al. (2005) Tbx20 dose-dependently regulates transcription factor networks required for mouse heart and motoneuron development. *Development* 132, 2463–2474.
172. Hoogaars, W.M., Tessari, A., Moorman, A.F., de Boer, P.A., Hagoort, J., Soufan, A.T., Campione, M. & Christoffels, V.M. (2004) The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart. *Cardiovasc Res* 62, 489–499.
173. Mesbah, K., Rana, M.S., Francou, A., van Duijvenboden, K., Papaioannou, V.E., Moorman, A.F., Kelly, R.G. & Christoffels, V.M. (2012) Identification of a Tbx1/Tbx2/Tbx3 genetic pathway governing pharyngeal and arterial pole morphogenesis. *Hum Mol Genet* 21, 1217–1229.
174. Singh, R., Horsthuis, T., Farin, H.F., Grieskamp, T., Norden, J., Petry, M., Wakker, V., Moorman, A.F., Christoffels, V. M. & Kispert, A. (2009) Tbx20 interacts with smads to confine tbx2 expression to the atrioventricular canal. *Circ Res* 105, 442–452.
175. Yarosh, W., Barrientos, T., Esmailpour, T., Lin, L., Carpenter, P.M., Osann, K., Anton-Culver, H. & Huang, T. (2008) TBX3 is overexpressed in breast cancer and represses p14 ARF by interacting with histone deacetylases. *Cancer Res* 68, 693–699.
176. Franco, D. and Campione, M. (2003). The role of Pitx2 during cardiac development. Linking left-right signaling and congenital heart diseases. *Trends Cardiovasc Med* 13, 157-63.
177. Bakker, M.L., Christoffels, V.M. & Moorman, A.F. (2010) The cardiac pacemaker and conduction system develops from embryonic myocardium that retains its primitive phenotype. *J Cardiovasc Pharmacol* 56, 6–15.
178. Greulich, F., Rudat, C. & Kispert, A. (2011) Mechanisms of T-box gene function in the developing heart. *Cardiovasc Res* 91, 212–222.
179. Christoffels, V.M., Mommersteeg, M.T., Trowe, M.O., Prall, O.W., de Gier-de Vries, C., Soufan, A.T., Bussen, M., Schuster-Gossler, K., Harvey, R.P., Moorman, A.F. & Kispert, A. (2006) Formation of the venous pole of the heart from an Nk2–5-negative precursor population requires Tbx18. *Circ Res* 98, 1555–1563.
180. Wiese, C., Grieskamp, T., Airik, R., Mommersteeg, M.T., Gardiwal, A., de Gier-de Vries, C., Schuster-Gossler, K., Moorman, A.F., Kispert,

- A. & Christoffels, V.M. (2009) Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3. *Circ Res* 104, 388–397.
181. Stieber, J., Herrmann, S., Feil, S., Loster, J., Feil, R., Biel, M., Hofmann, F. & Ludwig, A. (2003) The hyperpolarization- activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 15235–15240.
  182. Blaschke, R.J., Hahurij, N.D., Kuijper, S., Just, S., Wisse, L. J., Deissler, K., Maxelon, T., Anastassiadis, K., Spitzer, J., Hardt, S.E. et al. , et al. (2007) Targeted mutation reveals essential functions of the homeodomain transcription factor Shox2 in sinoatrial and pacemaking development. *Circulation* 115, 1830–1838.
  183. Espinoza-Lewis, R.A., Yu, L., He, F., Liu, H., Tang, R., Shi, J., Sun, X., Martin, J.F., Wang, D., Yang, J. & Chen, Y. (2009) Shox2 is essential for the differentiation of cardiac pacemaker cells by repressing Nk2–5. *Dev Biol* 327, 376–385.
  184. Hoogaars, W.M., Engel, A., Brons, J.F., Verkerk, A.O., de Lange, F.J., Wong, L.Y., Bakker, M.L., Clout, D.E., Wakker, V., Barnett, P., Ravesloot, J.H., Moorman, A.F., Verheijck, E.E. & Christoffels, V.M. (2007b) Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. *Genes Dev* 21, 1098–1112.
  185. Arnolds, D.E., Liu, F., Fahrenbach, J.P., Kim, G.H., Schillinger, K.J., Smemo, S., McNally, E.M., Nobrega, M.A., Patel, V.V. & Moskowitz, I.P. (2012) TBX5 drives Scn5a expression to regulate cardiac conduction system function. *J Clin Invest* 122, 2509–2518.
  186. Horsthuis, T., Buermans, H.P., Brons, J.F., Verkerk, A.O., Bakker, M.L., Wakker, V., Clout, D.E., Moorman, A.F. & t Hoen, P. A. & Christoffels, V. M., (2009) Gene expression profiling of the forming atrioventricular node using a novel tbx3-based node-specific transgenic reporter. *Circ Res* 105, 61–69.
  187. Rentschler, S., Morley, G.E. & Fishman, G.I. (2002) Molecular and functional maturation of the murine cardiac conduction system. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 67, 353–361.
  188. Valderrabano, M., Chen, F., Dave, A.S., Lamp, S.T., Klitzner, T.S. & Weiss, J.N. (2006) Atrioventricular ring reentry in embryonic mouse hearts. *Circulation* 114, 543–549.
  189. Hagendorff, A., Schumacher, B., Kirchhoff, S., Luderitz, B. & Willecke, K. (1999) Conduction disturbances and increased atrial

- vulnerability in Connexin40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation. *Circulation* 99,1508–1515.
190. Tamaddon, H.S., Vaidya, D., Simon, A.M., Paul, D.L., Jalife, J. & Morley, G.E. (2000) High-resolution optical mapping of the right bundle branch in connexin40 knockout mice reveals slow conduction in the specialized conduction system. *Circ Res* 87, 929–936.
  191. Bakker, M.L., Boukens, B.J., Mommersteeg, M.T., Brons, J. F., Wakker, V., Moorman, A.F. & Christoffels, V.M. (2008) Transcription factor Tbx3 is required for the specification of the atrioventricular conduction system. *Circ Res* 102, 1340–1349.
  192. Zhang, S.S., Kim, K.H., Rosen, A., Smyth, J.W., Sakuma, R., Delgado-Olguin, P., Davis, M., Chi, N.C., Puvion-Randall, V., Gaborit, N. et al. , et al. (2011) Iroquois homeobox gene 3 establishes fast conduction in the cardiac His-Purkinje network. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 13576–13581.
  193. Mommersteeg, M.T., Brown, N.A., Prall, O.W., de Gier-de Vries, C., Harvey, R.P., Moorman, A.F., and Christoffels, V.M. (2007). Pitx2c and Nkx2-5 are required for the formation and identity of the pulmonary myocardium. *Circ Res* 101, 902-9.
  194. Rentschler, S., Yen, A.H., Lu, J., Petrenko, N.B., Lu, M.M., Manderfield, L.J., Patel, V.V., Fishman, G.I. & Epstein, J. A. (2012) Myocardial notch signaling reprograms cardiomyocytes to a conduction-like phenotype. *Circulation* 126, 1058–1066.
  195. Ben-Shachar G, Arcilla RA, Lucas RV, Manasek FJ. Ventricular trabeculations in the chick embryo heart and their contribution to ventricular and muscular septal development. *Circ Res.* 1985; 57:759–766.
  196. Grego-Bessa J, Luna-Zurita L, del Monte G, Bolos V, Melgar P, Arandilla A, Garratt AN, Zang H, Mukoyama YS, Chen H, Shou W, Ballestar E, Esteller M, Rojas A, Perez-Pomares JM, de la Pompa JL. Notch signaling is essential for ventricular chamber development. *Developmental cell.* 2007; 12:415–429.
  197. Rentschler S, Zander J, Meyers K, France D, Levine R, Porter G, Rivkees SA, Morley GE, Fishman GI. Neuregulin-1 promotes formation of the murine cardiac conduction system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99:10464–10469.
  198. Tian X, Hu T, Zhang H, He L, Huang X, Liu Q, Yu W, He L, Yang Z, Yan Y, Yang X, Zhong TP, Pu WT, Zhou B. Vessel formation. De novo formation of a distinct coronary vascular population in neonatal heart. *Science (New York, NY).* 2014; 345:90–94.

199. Moorman AF, Christoffels VM. Development of the cardiac conduction system: A matter of chamber development. *Novartis Found Symp.* 2003; 250:25–34. discussion 34–43, 276–279.
200. Zhang W, Chen H, Qu X, Chang CP, Shou W. Molecular mechanism of ventricular trabeculation/compaction and the pathogenesis of the left ventricular noncompaction cardiomyopathy (lvnc). *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2013; 163C:144–156.
201. Tamura K, Taniguchi Y, Minoguchi S, Sakai T, Tun T, Furukawa T, Honjo T. Physical interaction between a novel domain of the receptor notch and the transcription factor rbp-j kappa/su(h). *Curr Biol.* 1995; 5:1416–1423.
202. Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A. Signalling downstream of activated mammalian notch. *Nature.* 1995; 377:355–358.
203. Chen H, Shi S, Acosta L, Li W, Lu J, Bao S, Chen Z, Yang Z, Schneider MD, Chien KR, Conway SJ, Yoder MC, Haneline LS, Franco D, Shou W. Bmp10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Development.* 2004; 131:2219–2231.
204. Zhang W, Chen H, Wang Y, Yong W, Zhu W, Liu Y, Wagner GR, Payne RM, Field LJ, Xin H, Cai CL, Shou W. Tbx20 transcription factor is a downstream mediator for bone morphogenetic protein-10 in regulating cardiac ventricular wall development and function. *J Biol Chem.* 2011; 286:36820–36829.
205. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the erbb signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2:127–137.
206. Liu J, Bressan M, Hassel D, Huisken J, Staudt D, Kikuchi K, Poss KD, Mikawa T, Stainier DY. A dual role for erbb2 signaling in cardiac trabeculation. *Development.* 2010; 137:3867–3875.
207. Masumura T, Yamamoto K, Shimizu N, Obi S, Ando J. Shear stress increases expression of the arterial endothelial marker ephrinb2 in murine es cells via the vegf-notch signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29:2125–2131.
208. Milgrom-Hoffman M, Harrelson Z, Ferrara N, Zelzer E, Evans SM, Tzahor E. The heart endocardium is derived from vascular endothelial progenitors. *Development.* 2011; 138:4777–4787.
209. Tian Y, Morrissey EE. Importance of myocyte-nonmyocyte interactions in cardiac development and disease. *Circ Res.* 2012; 110:1023–1034.
210. Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T, Biesterfeldt J, Augustine ML, Calabro A, Kubalak S, Klewer SE, McDonald JA. Disruption of

- hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest.* 2000; 106:349–360.
211. Camenisch TD, Schroeder JA, Bradley J, Klewer SE, McDonald JA. Heart-valve mesenchyme formation is dependent on hyaluronan-augmented activation of erbb2-erbb3 receptors. *Nat Med.* 2002; 8:850–855.
  212. Stankunas K, Hang CT, Tsun ZY, Chen H, Lee NV, Wu JI, Shang C, Bayle JH, Shou W, Iruela-Arispe ML, Chang CP. Endocardial brg1 represses *adamts1* to maintain the microenvironment for myocardial morphogenesis. *Dev Cell.* 2008; 14:298–311.
  213. Cooley MA, Fresco VM, Dorlon ME, Twal WO, Lee NV, Barth JL, Kern CB, Iruela-Arispe ML, Argraves WS. Fibulin-1 is required during cardiac ventricular morphogenesis for versican cleavage, suppression of erbb2 and erk1/2 activation, and to attenuate trabecular cardiomyocyte proliferation. *Dev Dyn.* 2012; 241:303–314.
  214. Bressan M, Yang PB, Louie JD, Navetta AM, Garriock RJ, Mikawa T. Reciprocal myocardial-endocardial interactions pattern the delay in atrioventricular junction conduction. *Development.* 2014; 141:4149–4157.
  215. Shikama N, Lutz W, Kretzschmar R, Sauter N, Roth JF, Marino S, Wittwer J, Scheidweiler A, Eckner R. Essential function of p300 acetyltransferase activity in heart, lung and small intestine formation. *EMBO J.* 2003; 22:5175–5185.
  216. Chang CP, Bruneau BG. Epigenetics and cardiovascular development. *Annu Rev Physiol.* 2012; 74:41–68.
  217. Voss AK, Vanyai HK, Collin C, Dixon MP, McLennan TJ, Sheikh BN, Scambler P, Thomas T. *Moz* regulates the *tbx1* locus, and *moz* mutation partially phenocopies digeorge syndrome. *Dev Cell.* 2012; 23:652–663.
  218. McElhinney DB, Driscoll DA, Levin ER, Jawad AF, Emanuel BS, Goldmuntz E. Chromosome 22q11 deletion in patients with ventricular septal defect: Frequency and associated cardiovascular anomalies. *Pediatrics.* 2003; 112:e472.
  219. Montgomery RL, Davis CA, Potthoff MJ, Haberland M, Fielitz J, Qi X, Hill JA, Richardson JA, Olson EN. Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. *Genes Dev.* 2007; 21:1790–1802.

220. Trivedi CM, Zhu W, Wang Q, Jia C, Kee HJ, Li L, Hannenhalli S, Epstein JA. Hopx and hdac2 interact to modulate gata4 acetylation and embryonic cardiac myocyte proliferation. *Dev Cell*. 2010; 19:450–459.
221. Chen F, Kook H, Milewski R, Gitler AD, Lu MM, Li J, Nazarian R, Schnepf R, Jen K, Biben C, Runke G, Mackay JP, Novotny J, Schwartz RJ, Harvey RP, Mullins MC, Epstein JA. Hop is an unusual homeobox gene that modulates cardiac development. *Cell*. 2002; 110:713–723.
222. Zaidi S, Choi M, Wakimoto H, Ma L, Jiang J, Overton JD, Romano-Adesman A, Bjornson RD, Breitbart RE, Brown KK, Carriero NJ, Cheung YH, Deanfield J, DePalma S, Fakhro KA, Glessner J, Hakonarson H, Italia MJ, Kaltman JR, Kaski J, Kim R, Kline JK, Lee T, Leipzig J, Lopez A, Mane SM, Mitchell LE, Newburger JW, Parfenov M, Pe'er I, Porter G, Roberts AE, Sachidanandam R, Sanders SJ, Seiden HS, State MW, Subramanian S, Tikhonova IR, Wang W, Warburton D, White PS, Williams IA, Zhao H, Seidman JG, Brueckner M, Chung WK, Gelb BD, Goldmuntz E, Seidman CE, Lifton RP. De novo mutations in histone-modifying genes in congenital heart disease. *Nature*. 2013; 498:220–223.
223. Gottlieb PD, Pierce SA, Sims RJ, Yamagishi H, Weihe EK, Harriss JV, Maika SD, Kuziel WA, King HL, Olson EN, Nakagawa O, Srivastava D. Bop encodes a muscle-restricted protein containing mynd and set domains and is essential for cardiac differentiation and morphogenesis. *Nat Genet*. 2002; 31:25–32.
224. Chamberlain AA, Lin M, Lister RL, Maslov AA, Wang Y, Suzuki M, Wu B, Greally JM, Zheng D, Zhou B. DNA methylation is developmentally regulated for genes essential for cardiogenesis. *J Am Heart Assoc*. 2014; 3
225. Monzen K, Ito Y, Naito AT, Kasai H, Hiroi Y, Hayashi D et al. A crucial role of a high mobility group protein HMGA2 in cardiogenesis. *Nat Cell Biol* 2008;10:567–574.
226. van Weerd JH, Koshiba-Takeuchi K, Kwon C, et al. Epigenetic factors and cardiac development. *Cardiovasc Res*. 2011;91:203–211.
227. Lickert H, Takeuchi JK, Von Both I, Walls JR, McAuliffe F, Adamson SL, Henkelman RM, Wrana JL, Rossant J, Bruneau BG. Baf60c is essential for function of baf chromatin remodelling complexes in heart development. *Nature*. 2004; 432:107–112.

228. Takeuchi JK, Lou X, Alexander JM, Sugizaki H, Delgado-Olguín P, Holloway AK, Mori AD, Wylie JN, Munson C, Zhu Y, Zhou YQ, Yeh RF, Henkelman RM, Harvey RP, Metzger D, Chambon P, Stainier DY, Pollard KS, Scott IC, Bruneau BG. Chromatin remodelling complex dosage modulates transcription factor function in heart development. *Nat Commun.* 2011; 2:187.
229. Ho L, Crabtree GR. Chromatin remodelling during development. *Nature* 2010;463: 474–484.
230. Bruneau BG. Chromatin remodeling in heart development. *Curr Opin Genet Dev* 2010;20:505–511.
231. Wang W, Xue Y, Zhou S, Kuo A, Cairns BR, Crabtree GR. Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes. *Genes Dev* 1996;10:2117–2130.
232. Kadam S, Emerson BM. Transcriptional specificity of human SWI/SNF BRG1 and BRM chromatin remodeling complexes. *Mol Cell* 2003;11:377–389.
233. Biben C, Weber R, Kesteven S, Stanley E, McDonald L, Elliott DA, Barnett L, Köentgen F, Robb L, Feneley M, Harvey RP. Cardiac septal and valvular dysmorphogenesis in mice heterozygous for mutations in the homeobox gene *nkx2-5*. *Circ Res.* 2000; 87:888–895.
234. Stennard FA, Costa MW, Lai D, Biben C, Furtado MB, Solloway MJ, McCulley DJ, Leimena C, Preis JI, Dunwoodie SL, Elliott DE, Prall OW, Black BL, Fatkin D, Harvey RP. Murine *t-box* transcription factor *tbx20* acts as a repressor during heart development, and is essential for adult heart integrity, function and adaptation. *Development.* 2005; 132:2451–2462.
235. Nührenberg T, Gilsbach R, Preissl S, Schnick T, Hein L. Epigenetics in cardiac development, function, and disease. *Cell Tissue Res.* 2014; 356:585–600.
236. Hang CT, Yang J, Han P, Cheng HL, Shang C, Ashley E et al. Chromatin regulation by Brg1 underlies heart muscle development and disease. *Nature* 2010;466:62–67.
237. Côté J, Quinn J, Workman JL, Peterson CL. Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* 1994;265:53–60.
238. Takeuchi JK, Bruneau BG. Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature* 2009;459:708–712.

239. Takeuchi JK, Lickert H, Bisgrove BW, Sun X, Yamamoto M, Chawengsaksophak K et al. Baf60c is a nuclear Notch signaling component required for the establishment of left-right asymmetry. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:846–851.
240. Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S et al. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell* 2001;106:709–721.
241. Zhang Y, LeRoy G, Seelig HP, Lane WS, Reinberg D. The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell* 1998;95:279–289.
242. Xue Y, Wong J, Moreno GT, Young MK, Co^ te´ J, Wang W. NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell* 1998;2:851–861.
243. Nimura K, Ura K, Shiratori H, Ikawa M, Okabe M, Schwartz RJ et al. A histone H3 lysine 36 trimethyltransferase links Nkx-5 to Wolf-Hirschhorn syndrome. *Nature* 2009;460:287–292.
244. Lu J, Jeong HW, Kong N, Yang Y, Carroll J, Luo HR et al. Stem cell factor SALL4 represses the transcriptions of PTEN and SALL1 through an epigenetic repressor complex. *PloS One* 2009;4:e5577.
245. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116:281–297.
246. Chen JF, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* 2006; 38:228–233.
247. Rao PK, et al. Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006; 103:8721–8726.
248. Kwon C, et al. MicroRNA1 influences cardiac differentiation in *Drosophila* and regulates Notch signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005; 102:18986–18991.
249. Yang B, et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat. Med.* 2007; 13:486–491.
250. Martinez S. R., Gay M. S., Zhang L. Epigenetic mechanisms in heart development and disease. *Drug Discovery Today*. 2015;20(7):799–811. doi: 10.1016/j.drudis.2014.12.018.



251. Liu N, et al. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev.* 2008; 22:3242–3254.
252. Sluijter JP, et al. MicroRNA-1 and -499 regulate differentiation and proliferation in humanderived cardiomyocyte progenitor cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 30:859–868.
253. van Rooij E, Olson EN. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J. Clin. Invest.* 2007; 117:2369–2376.
254. Apitz C, Webb GD, Redington AN. Tetralogy of Fallot. *Lancet* 2009;374(9699):1462–71.
255. Kalra N, Klewer SE, Raasch H, et al. Update on tetralogy of Fallot for the adult cardiologist including a brief historical and surgical perspective. *Congenit Heart Dis* 2010;5(3):208–19.
256. Stensen N. Embrio monstro affinis parisiis dissectum. *Acta Med Philos Hafniensa* 1671–72; 1: 202–03.
257. Hunter W. Medical observations and inquiries. London: Private publication, 1784: 417–19.
258. Farre JR (1914) Pathological researches. Essay 1. On the malformation of the heart. Longman, Hurst, Rees, Orm and Brown, London, p 21
259. Peacock TB (1866) Malformation of the heart, 2 edn. Churchill, London 35:58-60
260. Von Rokitansky KF (1875) Die Defekte der Scheidewand des Herzens. *Pathologisch- Anatomisch Wilhelm Braunmuller*, Vienna, pp 27-29
261. Fallot A (1888) Contribution a l'anatomie patologique de la maladie bleue (cyanose cardiaque). *Marseille Med* 25:77-93
262. Allwork SP (1988) Tetralogy of Fallot: the centenary of the name. A new translation of the first of Fallot's papers. *Eur J Cardio Thorac Surg* 2:368-392a de
263. Abbott ME (1936) Atlas of congenital cardiac disease. Am Heart Association, New York, pp46-47
264. Frescura C, Thiene G.; Anatomy of Tetralogy of Fallot, In: Chessa M., Giamberti A., The Right Ventricle in Adults with Tetralogy of Fallot; Italia: Springer-Verlag 2012, pag 3-25.
265. Bailliard F, Anderson RH (2009) Tetralogy of Fallot. *Orphanet J Rare Diseases* 4:2-12

266. Shinebourne, E.A., S.V. Babu-Narayan, and J.S. Carvalho, Tetralogy of Fallot: from fetus to adult. *Heart*, 2006. 92(9): p. 1353-9.
267. Shinebourne EA, A.R., Fallot's tetralogy, in *Paediatric cardiology*, B.E. Anderson RH, Macartney FJ, Rigby ML, Shinebourne EA, Tynan M, Editor. 2002, Churchill Livingstone: London. p. 502-1213.
268. Siwik E, P.C., Zahka K, Goldmuntz E, Tetralogy of Fallot, in *Moss and Adams' Heart disease in infants, children and adolescents*, G.H. Allen H, Clark E, Driscoll D, Editor. 2001, Lippincot Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 880-902.
269. Bosi, G., et al., The Italian Multicentric Study on Epidemiology of Congenital Heart Disease: first step of the analysis. Working Party of the Italian Society of Pediatric Cardiology. *Cardiol Young*, 1999. 9(3): p. 291-9.
270. Qu Y, Liu X, Zhuang J, Chen G, Mai J, Guo X, Ou Y, Chen J, Gong W, Gao X, Wu Y, Nie Z. Incidence of Congenital Heart Disease: The 9-Year Experience of the Guangdong Registry of Congenital Heart Disease, China. *PLoS One*. 2016 Jul 13;11(7):e0159257. doi:10.1371/journal.pone.0159257. eCollection 2016.
271. Huehnergath, K.V., et al., Repaired tetralogy of Fallot in the adult: monitoring and management. *Heart*, 2008. 94(12): p. 1663-9.
272. Friedman BA, Hlavacek A, Chessa K et al (2010) Clinico-morphological correlations in the categorization of holes between the ventricles. *Ann Ped Cardiol* 3:12-24
273. Anderson RH, Jacobs ML (2008) The anatomy of tetralogy of Fallot. *Cardiol Young* 18:12- 21
274. Van Praagh R, Van Praagh S, Nebesar RA et al (1970) Tetralogy of Fallot: underdevelopment of the pulmonary infundibulum and its sequelae. *Am J Cardiol* 26:25-33
275. Roekens CN, Zuckerber AL: Emergency management of hypercyanotic crises in tetralogy of Fallot. *Annals of Emergency Medicine* 1995, 25(2):256-258.
276. Kothari SS: Mechanism of cyanotic spells in tetralogy of Fallot– the missing link? *International Journal of Cardiology* 1992,37(1):1-5
277. Van Praagh R (1989) Etienne-Louis Arthur Fallot and his tetralogy: a new translation of Fallot's summary and a modern reassessment of this anomaly. *Eur J Cardio-thorac Surg* 3:381-386
278. Howell CE, Ho SY, Anderson RH, Elliott MJ (1990) Variation within the fibrous skeleton and ventricular outflow tracts in tetralogy of Fallot. *Ann Thorac Surg* 50:450-457

279. Anderson RH, Becker AE (1990) Etienne-Louis Arthur Fallot and his tetralogy: a new translation of Fallot's summary and a modern reassessment of this anomaly. Letter to Editor. *Eur J Cardio-thorac Surg* 4:229-230
280. Gatzoulis MA, Soukias N, Ho SY, Anderson RH (1990) Echocardiographic and morphological correlation in tetralogy of Fallot. *Eur Heart J* 20:221-231
281. Ho SY, Anderson RH (1990) The modern assessment of tetralogy of Fallot: morphological aspects. *Chir Torac* 43:101-110
282. Moss and Adam's Heart Disease in Infants, Children and Adolescents Edited by: Allen HD, Clark EB, Gutgesell HP, et al. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001:880-902.
283. Chowdhury UK, Mishra AK, Ray R, Kalaivani M, Reddy SM, Venugopal P: Histopathologic changes in ascending aorta and risk factors related to histopathologic conditions and aortic dilatation in patients with tetralogy of Fallot. *Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery* 2008, 135(1):69-77.
284. Tan JL, Gatzoulis MA, Ho SY: Aortic root disease in tetralogy of Fallot. *Current Opinion in Cardiology* 2006, 21(6):569-572.
285. Oppenheimer-Dekker A, Gittenberger De Groot AC, Bartelings MM et al (1985) Abnormal architecture of the ventricles in hearts with an overriding aortic valve and a perimembranous ventricular septal defect ("Eisenmenger VSD"). *Int J Cardiol* 9:341-355
286. Assenza GE, Landzberg MJ; Phatophysiology in tetralogy of fallot In: Chessa M., Giamberti A., The Right Ventricle in Adults with Tetralogy of Fallot; Italia: Springer-Verlag 2012, pag 47-59
287. Bodhey NK, Beerbaum P, Sarikouch S, Kropf S, Lange P, Berger F, et al. Functional analysis of the components of the right ventricle in the setting of tetralogy of Fallot. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2008;1:141–7.
288. Dore A, Houde C, Chan KL et al. Angiotensin receptor blockade and exercise capacity in adults with systemic right ventricles: a multicenter, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Circulation*. 2005;112:2411-2416
289. Babu-Narayan S.V., Uebing A., Davlourous P.A., Kemp M., Davidson S., Dimopoulos K., Bayne S., Pennell D.J., Gibson D.G., Flather M., Kilner P.J., Li W., Gatzoulis M.A. Randomised trial of ramipril in repaired tetralogy of Fallot and pulmonary regurgitation. *Int. J. Cardiol*. 2012;154:299–305.

290. Minegishi S, Kitahori K, Murakami A, Ono M. Mechanism of pressure-overload right ventricular hypertrophy in infant rabbits. *Int Heart J*. 2011;52:56–60.
291. Urashima T, Zhao M, Wagner R, Fajardo G, Farahani S, Quertermous T, Bernstein D. Molecular and physiological characterization of rv remodeling in a murine model of pulmonary stenosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:H1351–H1368.
292. Reddy S, Osorio JC, Duque AM, Kaufman BD, Phillips AB, Chen JM, Quaegebeur J, Mosca RS, Mital S. Failure of right ventricular adaptation in children with tetralogy of Fallot. *Circulation*. 2006;114(1 Suppl):I37–42.
293. Thiene G, Bortolotti U, Gallucci V et al. Pulmonary atresia with ventricular septal defect. *Br Heart J* 1977;39: 1233-1240.
294. Thiene G, Frescura C, Bini RM et al. Histology of pulmonary arterial supply in pulmonary atresia with ventricular septal defect. *Br Heart J* 1981;60:1066-1074.
295. Anderson RH, Devine WA, Del Nido P. The surgical anatomy of tetralogy of Fallot with pulmonary atresia rather than pulmonary stenosis. *J Cardiac Surg* 1991; 6:41-58.
296. Ho YS, Catani A, Seo JW. Arterial supply to the lungs in tetralogy of Fallot with pulmonary atresia or critical pulmonary stenosis. *Cardiol Young* 1992; 2:65-72.
297. Nichols DG, Ungerleider RM, Spevall PJ, editor. *Critical Heart Disease in Infants and Children*. 2. Philadelphia: Mosby; 2006. pp. 755–766.
298. Jonas RA, editor. *Comprehensive Surgical Management of Congenital Heart Disease*. New York: Oxford University Press; 2004. pp. 279–300.
299. Thiene G, Frescura C, Di Donato R, Gallucci V. Complete atrioventricular canal with conotruncal malformations: anatomical observations in 13 specimens. *Europ J Cardiol* 1979; 9:199-213
300. Bharati S, Kirklin JW, McAllister HA, Lev M. The surgical anatomy of common atrioventricular orifice associated with tetralogy of Fallot, double outlet right ventricle and complete regular transposition. *Circulation* 1980; 61:1142-1149.
301. Ricci M, Tchervenkov CI, Jacobs JP et al. Surgical correction for patients with tetralogy of Fallot and common atrioventricular junction. *Cardiol Young* 2008;18:29-38.

302. Faggian G, Frescura C, Thiene G et al. Accessory tricuspid valve tissue causing obstruction of the ventricular septal defect in tetralogy of Fallot. *Br Heart J.* 1983; 49:318-324.
303. Suzuki A, Ho YS, Anderson RH, Deanfield JE. Further morphologic studies on tetralogy of Fallot with particular emphasis on the prevalence and structure of the membranous flap. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1990;99:528-535.
304. Emmanouilides GC, Thanopoulos B, Siassi B, Fishbein M (1976) "Agenesis" of ductus arteriosus associated with the syndrome of tetralogy of Fallot and absent pulmonary valve. *Am J Cardiol* 37:403-409
305. Rabinovitch M, Grady S, David I et al (1982) Compression of intrapulmonary bronchi by abnormally branching pulmonary arteries associated with absent pulmonary valve. *Am J Cardiol* 50:804-813
306. Milanesi O, Talenti E, Pellegrino PA, Thiene G (1984) Abnormal pulmonary artery branching in tetralogy of Fallot with absent pulmonary valve. *Int J Cardiol* 6:375-380.
307. Thiene G, Mazzucco A, Anderson RH et al. Tetralogy of Fallot after surgery: autopsy review of 14 cases. *Human Pathol.* 1984;15:995-1018.
308. Velasquez G, Nath PH, Castaneda-Zuniga WR et al. Aberrant left subclavian artery in tetralogy of Fallot. *Am J Cardiol.* 1980;45:811-818.
309. Li J, Soukias ND, Carvalho JS, Ho SY. Coronary arterial anatomy in tetralogy of Fallot: morphological and clinical correlation. *Heart* 1988; 80:74-183
310. Digilio MC, Dallapiccola B, Marino B; Genetics, In: Chessa M., Giamberti A., *The Right Ventricle in Adults with Tetralogy of Fallot*; Italia: Springer-Verlag 2012, pag 27-37.
311. Ferencz C, Loffredo CA, Correa-Villasenor A, Wilson PD; Genetic and environmental risk factors of major cardiovascular malformations. *The Baltimore-Washington Infant Study 1981-1989.* Futura Publishing Company Inc, 1997, Armonk, New York
312. Marino B, Digilio MC, Grazioli S et al; Associated cardiac anomalies in isolated and syndromic patients with tetralogy of Fallot. *Am J Cardiol* 1996; 77:505-508
313. Digilio MC, Marino B, Grazioli S, Agostino D, Giannotti A, Dallapiccola B. Comparison of occurrence of genetic syndromes in ventricular septal defect with pulmonic stenosis (classic tetralogy of Fallot)

- versus ventricular septal defect with pulmonic atresia. *Am J Cardiol.* 1996;77:1375–1376.
314. Rauch R, Hofbeck M, Zweier C et al. Comprehensive genotype-phenotype analysis in 230 patients with tetralogy of Fallot. *J Med Genet.* 2010; 47:321-331
  315. Guida V, Chiappe F, Ferese R et al. Novel and recurrent JAG1 mutations in patients with tetralogy of Fallot. *Clin Genet.* 2011; 80:591-594
  316. Marino B, Digilio MC. Congenital heart disease and genetic syndromes: Correlation between cardiac phenotype and genotype. *Cardiovasc Pathol.* 2000; 9:303-315
  317. Jenkins KJ, et al. Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation.* 2007;115:2995–3014.
  318. Gilboa S. et al. Relation between ambient air quality and selected birth defects, seven county study, Texas, 1997–2000. *American Journal of Epidemiology* 162, 238–252 (2005).
  319. Musewe NN, Alexander DJ, Teshima I et al. Echocardiographic evaluation of the spectrum of cardiac anomalies associated with trisomy 18 and 13. *J Am Coll Cardiol.* 1990;15:673-677
  320. Karr SS, Brenner JI, Loffredo C et al. Tetralogy of Fallot. The spectrum of severity in a regional study, 1981-1985. *Am J Dis Child.* 1992;146:121-124
  321. Marino B. Patterns of congenital heart disease and associated cardiac anomalies in children with Down syndrome. In: Marino B, Pueschel SM (eds) *Heart disease in persons with Down syndrome.* Brookes, Baltimore, 1996, pp 33-40
  322. Down JL. Observations on an ethnic classification of idiots. *Clinical Lecture Reports.* London Hosp 1866;3:259-9.
  323. Gorlin RJ, Cohen MM, Levin SL. *Syndromes of the head and neck.* 3rd ed. New York: Oxford University Press, 1990; p. 33-40
  324. Hernández I, Manrique RD. prevalencia de síndrome de Down en CEHANI-ESE, San Juan de Pasto Colombia. 1998-2003. *Nova-publicacion cientifica* ISSN:1794-2470 VOL.4 No. 5 enero-junio de 2006:1-116

325. American Academy of Pediatrics. Committee on Genetics: American Academy of Pediatrics: Health Supervision for Children With Down syndrome. Pediatrics 2001;107: 442-9.
326. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 190685: 02/15/2017: World Wide Web URL: <https://omim.org/>
327. Gallo K. Prevalencia de las cardiopatías congénitas en pacientes con síndrome de Down en cuatro hospitales pediátricos de la ciudad de Bogotá en los años 2011 – 2014 [Tesis]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Pediatría; 2015.
328. Marino B. Congenital heart disease in patients with Down's syndrome: anatomic and genetic aspects. Biomed & Pharmacother. 1993; 47:197-200.
329. Vergara P, Digilio MC, De Zorzi A et al. Genetic heterogeneity and phenotypic anomalies in children with atrioventricular canal defect and tetralogy of Fallot. Clin Dysmorphol. 2006; 15:65-70
330. Gamarra EE, Combariza DA, Ramos GO. Caracterización de cardiopatías congénitas en pacientes con síndrome de Down en una institución especializada de Bogotá. [Tesis]. Bogotá: Universidad del Rosario, Universidad CES, Escuela de medicina y Ciencias de la Salud; Junio de 2013.
331. Giglio S, Graw SL, Gimelli G et al. Deletion of a 5-cM region at chromosome 8p23 is associated with a spectrum of congenital heart defects. Circulation. 2000;102:432-437
332. Devriendt K, Matthijs G, Van Dael R et al. Delineation of the critical deletion region for congenital heart defects, on chromosome 8p23.1. Am J Hum Genet. 1999;64:1119-1126
333. Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI et al. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. J Med Genet. 1997;34:798-804
334. McDonald-McGinn DM, Kirschner R, Goldmuntz E et al. The Philadelphia story. The 22q11.2 deletion: report on 250 patients. Genet Couns, 1999;10:11-24
335. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 188400: 04/05/2016: World Wide Web URL: <https://omim.org/>
336. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 192430: 03/03/2017: World Wide Web URL: <https://omim.org/>

337. Lindsay EA, Vitelli F, Su H et al. Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature* 2001;410:97-101
338. Marino B, Digilio MC, Toscano A et al. Anatomic patterns of conotruncal defects associated with deletion 22q11. *Genet Med* 2001;3:45-48
339. Goldmuntz E, Clark BJ, Mitchell LE et al. Frequency of 22q11 deletions in patients with conotruncal defects. *J Am Coll Cardiol*. 1998; 32:492-498
340. Goldmuntz E, Geiger E, Benson W. NKX2.5 mutations in patients with tetralogy of Fallot. *Circulation*. 2001;104:2565-2568
341. Momma K, Kondo C, Matsuoka R (1996) Tetralogy of Fallot with pulmonary atresia associated with chromosome 22q11 deletion. *J Am Coll Cardiol* 27:198-202
342. Anaclerio S, Marino B, Carotti A et al. Pulmonary atresia with ventricular septal defect: prevalence of deletion 22q11 in the different anatomic patterns. *Ital Heart*. 2001; J 2:384-387
343. Salazar M, Villalba G, Mateus H, Villegas V, Fonseca D, Núñez F et al. Análisis de microdeleciones en 22q11 en pacientes colombianos con cardiopatía congénita no sindrómica. *Invest. clín* [Internet]. 2011 Dic [citado 2017 Jul 25] ; 52( 4 ): 334-343. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0535-51332011000400005&lng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332011000400005&lng=es).
344. McElhinney DB, Krantz ID, Bason L et al. Analysis of cardiovascular phenotype and genotype-phenotype correlation in individuals with a JAG1 mutation and/or Alagille syndrome. *Circulation* 2002;106:2567-2574
345. Loomes KM, Underkoffler LA, Morabito et al. The expression of JAGGED1 in the developing mammalian heart correlates with cardiovascular disease in Alagille syndrome. *Hum Molec Genet* 1999;8:2443-2449
346. Spinner NB, Leonard LD, Krantz ID. Alagille syndrome, in *Gene Reviews*, R.A. Pagon , et al., Editors. 1993: Seattle (WA).
347. Crosnier C, Driancourt C, Raynaud N, et al. Mutations in JAGGED1 gene are predominantly sporadic in Alagille syndrome. *Gastroenterology*. 1999;116:1141–1148.
348. Bauer RC, Laney AO, Smith R, Gerfen J, Morrisette JJ, Woyciechowski S, Garbarini J, Loomes KM, Krantz ID, Urban Z, et al.



- Jagged1 (JAG1) mutations in patients with Tetralogy of Fallot or pulmonic stenosis. *Hum Mutat.* 2010;31:594–601.
349. Lu F, Morrissette JJD, Spinner NB (2003) Conditional JAG1 Mutation Shows the Developing Heart Is More Sensitive Than Developing Liver to JAG1 Dosage. *Am J Hum Genet* 72: 6–6
  350. Majewski J., Schwartzentruber J.A., Caqueret A., Patry L., Marcadier J., Fryns J.P., Boycott K.M., Ste-Marie L.G., McKiernan F.E., Marik I., Van Esch H., Michaud J.L., Samuels M.E., FORGE Canada Consortium Mutations in NOTCH2 in families with Hajdu-Cheney syndrome. *Hum. Mutat.* 2011;32(10):1114–1117.
  351. Zanotti S, Canalis E. Notch and the skeleton. *Mol Cell Biol.* 2010;30:886–896.
  352. Penton AL, Leonard LD, Spinner NB. Notch signaling in human development and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2012;23:450–7.
  353. Trip J, van Stuijvenberg M, Dikkers FG, Pijnenburg MW (2002) Unilateral CHARGE association. *Eur J Pediatr* 161:78-80
  354. Aramaki M, Udaka T, Kosaki R, Makita Y, Okamoto N, Yoshihashi H, et al. Phenotypic spectrum of CHARGE syndrome with CHD7 mutations. *J Pediatr.* 2006;148:410–414.
  355. Vallaster M, Vallaster CD, Wu SM. Epigenetic mechanisms in cardiac development and disease. *Acta biochimica et biophysica Sinica.* 2012;44:92–102.
  356. Pizzuti A, Sarkozy A, Newton AL et al. Mutations in ZFPM2/FOG2 gene in sporadic cases of tetralogy of Fallot. *Hum Genet.* 2003;22:372-377
  357. Sperling S, Grimm CH, Dunkel I et al. Identification and functional analysis of CITED2 mutations in patients with congenital heart defects. *Hum Mutation* 2005;26:575-582
  358. Roessler E, Ouspenskaia MV, Karkera JD et al (2008) Reduced NODAL signaling strength via mutation of several pathway members including FOXH1 is linked to human heart defects and holoprosencephaly. *Am J Hum Genet* 83:18-29
  359. Griffin HR, Topf A, Glen E et al. Systematic survey of variants in TBX1 in non-syndromic tetralogy of Fallot identifies a novel 57 base pair deletion that reduces transcriptional activity but finds no evidence for association with common variants. *Heart* 2010;96:1651-1655
  360. Topf A, Griffin HR, Hall DH et al. Gene screening of the secondary heart field network in tetralogy of Fallot patients. *Heart* 2011;97(Suppl 1):A76 (Abstract).

361. Guida V, Ferese R, Rocchetti M, et al. A variant in the carboxyl-terminus of connexin 40 alters GAP junctions and increases risk for tetralogy of Fallot. *Eur J Hum Genet* 2013;21:69–75.
362. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006;444: 444–454
363. Greenway SC, Pereira AC, Lin JC et al. De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of Fallot. *Nat Genet* 2009;41:931-935
364. Wang J, Xie XD, Zhou S et al. The study of copy number variations in the regions of NOTCH1 among Chinese and TOF patients. *Int J Cardiol* 2011;14:444-484
365. Soemedi R, et al. Phenotype-specific effect of chromosome 1q21.1 rearrangements and GJA5 duplications in 2436 congenital heart disease patients and 6760 controls. *Hum Mol Genet.* 2012;21:1513–1520.
366. Thienpont B, Mertens L, de Ravel T, Eyskens B, Boshoff D, Maas N, Fryns JP, Gewillig M, Vermeesch JR, Devriendt K 2007. Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients. *Eur Heart J* 28: 2778–2784
367. Hitz MP, Lemieux-Perreault LP, Marshall C, Feroz-Zada Y, Davies R, Yang SW, Lionel AC, D'Amours G, Lemyre E, Cullum R, et al. 2012. Rare copy number variants contribute to congenital left-sided heart disease. *PLoS Genet* 8: e1002903.
368. Payne AR, Chang SW, Koenig SN, Zinn AR, Garg V 2012. Submicroscopic chromosomal copy number variations identified in children with hypoplastic left heart syndrome. *Pediatr Cardiol* 33: 757–763
369. Gelb BD, Chung WK. Complex genetics and the etiology of human congenital heart disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4:a013953.
370. Silversides CK, Lionel AC, Costain G, Merico D, Migita O, Liu B, Yuen T, Rickaby J, Thiruvahindrapuram B, Marshall CR, et al. 2012. Rare copy number variations in adults with tetralogy of Fallot implicate novel risk gene pathways. *PLoS Genet* 8: e1002843.
371. Botto L, Khoury MJ, Mastroiacovo P et al. The spectrum of congenital anomalies of the VATER association: An international study. *Am J Med Genet.* 1997;71:8-15

372. Digilio MC, Calzolari F, Capolino R et al. Congenital heart defects in patients with Oculo-Auriculo-Vertebral spectrum (Goldenhar syndrome). *Am J Med Genet.* 2008;146A:1815-1819
373. McElhinney DB, Geiger E, Blinder J et al. Nkx2.3 mutations in patients with congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:1650-1655
374. Tsuchihashi, T. et al. Hand2 function in second heart field progenitors is essential for cardiogenesis. *Dev Biol* 2011; 351, 62–69
375. Butler TL, Esposito G, Blue GM, et al. GATA4 mutations in 357 unrelated patients with congenital heart malformation. *Genet Test Mol Biomarkers* 2010;14:797–802.
376. Liu L, Li Y, Tollefsbol TO: Gene-environment interactions and epigenetic basis of human diseases. *Curr Issues Mol Biol* 2008, 10(1–2):25–36.
377. Goll MG, Bestor TH: Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2005, 74:481–514
378. Jones PA, Baylin SB: The epigenomics of cancer. *Cell* 2007, 128(4):683–692.
379. Vaitkiene P, Skiriute D, Skauminas K, Tamasauskas A: GATA4 and DcR1 methylation in glioblastomas. *Diagn Pathol* 2013, 8:7
380. Rahmatpanah FB, Carstens S, Guo J, Sjahputera O, Taylor KH, Duff D, Shi H, Davis JW, Hooshmand SI, Chitma-Matsiga R, et al: Differential DNA methylation patterns of small B-cell lymphoma subclasses with different clinical behavior. *Leukemia* 2006, 20(10):1855–1862.
381. Feng Q, Balasubramanian A, Hawes SE, Toure P, Sow PS, Dem A, Dembele B, Critchlow CW, Xi L, Lu H, et al: Detection of hypermethylated genes in women with and without cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 2005, 97 (4):273–282
382. Sheng W., Qian Y., Wang H., Ma X., Zhang P., Diao L., An Q., Chen L., Ma D., Huang G. DNA methylation status of NKX2-5, GATA4 and HAND1 in patients with tetralogy of Fallot. *BMC Med. Genomics.* 2013;6:46
383. van Beynum IM, Kapusta L, Bakker MK, et al. Protective effect of periconceptional folic acid supplements on the risk of congenital heart defects: a registry-based case-control study in the northern Netherlands. *Eur Heart J* 2010;31:464–71.

384. Hernández-Díaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med* 2000;343:1608–14
385. Bahado-Singh RO, Zaffra R, Albayarak S, Chelliah A, Bolinjkar R, Turkoglu O, et al. Epigenetic markers for newborn congenital heart defect (CHD). *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2015:1–7.
386. Rosenquist TM. Folate, homocysteine and the cardiac neural crest. *Dev Dyn* 2013;242:201–18.
387. Bahado-Singh RO, Bolinjkar R, Allen L, et al. Folate dysregulation and the development of hypoplastic left heart syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 2012;206:1 abstract #22.
388. Kazazian HH Jr: Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 2004, 303(5664):1626–1632.
389. Hoffmann MJ, Schulz WA: Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer. *Biochem Cell Biol* 2005, 83(3):296–321.
390. Chowdhury S, Cleves MA, MacLeod SL, James SJ, Zhao W, Hobbs CA: Maternal DNA hypomethylation and congenital heart defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011, 91(2):69–76
391. Saito K, Kawakami K, Matsumoto I, Oda M, Watanabe G, Minamoto T: Long interspersed nuclear element 1 hypomethylation is a marker of poor prognosis in stage IA non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2010, 16(8):2418–2426.
392. Sunami E, de Maat M, Vu A, Turner RR, Hoon DS: LINE-1 hypomethylation during primary colon cancer progression. *PLoS One* 2011, 6(4):e18884.
393. Zhang T, Wang L, Wang F, Guan J, Le J, Wu LH, Zou JZ, Zhao HZ, Pei LJ, Zheng XY: Relation between hypomethylation of long interspersed nucleotide elements and risk of neural tube defects. *Am J Clin Nutr* 2010, 91(5):1359–1367.
394. Jeerawat Nakkuntod YA, Apiwat Mutirangura, Nattiya Hirankarn: Hypomethylation of LINE-1 but not Alu in lymphocyte subsets of systemic lupus erythematosus patients. *Clin Chim Acta* 2011, 412:1457–1461.
395. Walther A, Houlston R, Tomlinson I: Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut* 2008, 57(7):941–950
396. Sheng W et al. LINE-1 methylation status and its association with tetralogy of fallot in infants. *BMC Med Genomics* 2012;6:5–20

397. Di Felice V, Zummo G: Tetralogy of Fallot as a Model to Study Cardiac Progenitor Cell Migration and Differentiation during Heart Development. *Trends Cardiovas Med* 2009, 19(4):130–135.
398. Schnetz MP, Bartels CF, Shastri K, Balasubramanian D, Zentner GE, Balaji R, Zhang X, et al. . Genomic distribution of CHD7 on chromatin tracks H3K4 methylation patterns, *Genome Res* 2009;19: 590-601
399. Zhang X, Guo C, Chen Y, Shulha HP, Schnetz MP, LaFramboise T, Bartels CF, et al. . Epitope tagging of endogenous proteins for genome-wide ChIP-chip studies, *Nat Methods* , 2008;5:163-165.
400. Wang Z, Zang C, Cui K, Schones DE, Barski A, Peng W, Zhao K. Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes, *Cell* , 2009;138:1019-1031
401. Lindsay EA, Vitelli F, Su H, Morishima M, Huynh T, Pramparo T, Jurecic V, et al. . Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice, *Nature* 2001;410:97-101
402. Carey AH, Kelly D, Halford S, Wadey R, Wilson D, Goodship J, Burn J, et al. . Molecular genetic study of the frequency of monosomy 22q11 in DiGeorge syndrome, *Am J Hum Genet* 1992;51:964-970
403. Lewin MB, Lindsay EA, Jurecic V, Goytia V, Towbin JA, Baldini A. A genetic etiology for interruption of the aortic arch type B, *Am J Cardiol* 1997;80:493-497
404. Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome: 30 years of study, *Dev Disabil Res Rev* 2008;14:3-10
405. Jerome LA, Papaioannou VE. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1, *Nat Genet* 2001;27: 286-291
406. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120:15-20.
407. Trionfini P, Benigni A, Remuzzi G. MicroRNAs in kidney physiology and disease. *Nat Rev Nephrol* 2015;11:23-33.
408. Simpson LJ, Ansel KM. MicroRNA regulation of lymphocyte tolerance and autoimmunity. *J Clin Invest* 2015;125:2242-9.
409. Chen J. Signaling pathways in HPV-associated cancers and therapeutic implications. *Rev Med Virol* 2015;25:1:24-53
410. Cai B, Pan Z, Lu Y. The roles of microRNAs in heart diseases: a novel important regulator. *Curr Med Chem* 2010;17:407-11.

411. Heidenreich PA, Trogdon JG, Khavjou OA, et al. Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circulation* 2011;123:933-44.
412. Zhao Y, Ransom JF, Li A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* 2007;129:303-17.
413. Chen J, Wang DZ. microRNAs in cardiovascular development. *J Mol Cell Cardiol* 2012;52:949-57.
414. Yu ZB, Han SP, Bai YF, et al. MicroRNA expression profiling in fetal single ventricle malformation identified by deep sequencing. *Int J Mol Med* 2012;29:53-60.
415. Smith T, Rajakaruna C, Caputo M, Emanuelli C. MicroRNAs in congenital heart disease. *Ann Transl Med Ann Transl Med* 2015;3(21):333.
416. Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004;23:4051-60.
417. Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1890-900.
418. Olson EN, Schneider MD. Sizing up the heart: development redux in disease. *Genes Dev* 2003;17:1937-56
419. Hoelscher SC, Doppler SA, Dreßen M, Lahm H, Lange R, Krane M. MicroRNAs: pleiotropic players in congenital heart disease and regeneration. *J Thorac Dis* 2017;9(Suppl 1):S64-S81.
420. O'Brien JE Jr, Kibiryeva N, Zhou XG, et al. Noncoding RNA expression in myocardium from infants with tetralogy of Fallot. *Circ Cardiovasc Genet* 2012;5:279-86.
421. Bittel DC, Kibiryeva N, Marshall JA, et al. MicroRNA-421 Dysregulation is Associated with Tetralogy of Fallot. *Cells* 2014;3:713-23.
422. Paul MH, Harvey RP, Wegner M, et al. Cardiac outflow tract development relies on the complex function of Sox4 and Sox11 in multiple cell types. *Cell Mol Life Sci* 2014;71:2931-45.
423. Schilham MW, Oosterwegel MA, Moerer P, et al. Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4. *Nature* 1996;380:711-4.
424. Liang D, Xu X, Deng F, et al. miRNA-940 reduction contributes to human Tetralogy of Fallot development. *J Cell Mol Med* 2014;18:1830-9.

425. Wu Y, Ma XJ, Wang HJ, et al. Expression of Cx43-related microRNAs in patients with tetralogy of Fallot. *World J Pediatr* 2014;10:138-44.
426. Anderson C, Catoe H, Werner R. MIR-206 regulates connexin43 expression during skeletal muscle development. *Nucleic Acids Res* 2006;34:5863-71.
427. Zhang J, Chang JJ, Xu F, et al. MicroRNA deregulation in right ventricular outflow tract myocardium in nonsyndromic tetralogy of fallot. *Can J Cardiol* 2013;29:1695-703.
428. Nora JJ: Multifactorial inheritance hypothesis for the etiology of congenital heart disease: the genetic-environmental interaction. *Circulation*. 1968; 38:604–617.
429. Hoess K, Goldmuntz E and Pyeritz RE: Genetic counseling for congenital heart disease: new approaches for a new decade. *Curr Cardiol Rep*. 2002;4:68–75.
430. Donofrio MT, Moon-Grady AJ, Hornberger LK, et al. Diagnosis and treatment of fetal cardiac disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2014;129:2183–242.
431. Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, et al: Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet*. 1997;15:30–35.
432. Wang X, Li P, Chen S, Xi L, Guo Y, Guo A, et al. Influence of genes and the environment in familial congenital heart defects. *Mol Med Rep*. 2014;9(2):695–700.
433. Shillingford AJ and Weiner S: Maternal issues affecting the fetus. *Clin Perinatol* 2001;28:31–70
434. Martínez-Frías ML, Bermejo E, Rodríguez-Pinilla E and Frías JL: Risk for congenital anomalies associated with different sporadic and daily doses of alcohol consumption during pregnancy: a case-control study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004;70:194–200.
435. Torfs CP and Christianson RE: Maternal risk factors and major associated defects in infants with Down syndrome. *Epidemiology* 1999;10:264–270.
436. Simeone RM, Tinker SC, Gilboa SM, et al. Proportion of selected congenital heart defects attributable to recognized risk factors. *Annals of epidemiology*. 2016;26(12):838-845. doi:10.1016/j.annepidem.2016.10.003.
437. Lamy M, Degrouchy J, Schweisguth O. Genetic and non-genetic factors in the etiology of congenital heart disease - study of 1188 cases. *Am J Hum Genet*. 1957;9(1):17-41.

438. Polani P, Campbell M. An aetiological study of congenital heart disease. *Ann Hum Genet.* 1955;19(3):209-30.
439. Nora JJ. Multifactorial inheritance hypothesis for the etiology of congenital heart diseases. the genetic-environmental interaction. *Circulation.* 1968;38(3):604-17.
440. Nora JJ, Nora AH. Genetic and environmental factors in the etiology of congenital heart diseases. *South Med J.* 1976;69(7):919-26.
441. Mitchell S, Sellmann A, Westphal M, Park J. Etiologic correlates in a study of congenital heart disease in 56,109 births. *Am J Cardiol.* 1971;28(6):653.
442. Nora JJ, Nora AH, Sommervi.Rj, Hill RM, Mcnamara DG. Maternal exposure to potential teratogens. *J Am Med Assoc.* 1967;202(12):1065.
443. Jenkins KJ, Correa A, Feinstein JA, Botto L, Britt AE, Daniels SR, et al. Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: Current knowledge a scientific statement from the american heart association council on cardiovascular disease in the young. *Circulation.* 2007;115(23):2995-3014.
444. Wang X., et al. 2004. Prevalence of human parvovirus B19 DNA in cardiac tissues of patients with congenital heart diseases indicated by nested PCR and in situ hybridization. *J. Clin. Virol.* 31:20–24
445. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* 2013 Nov 27;310(20):2191-4. doi: 10.1001/jama.2013.281053.
446. Mjaatvedt CH, Yamamura H, Wessels A, Ramsdell A, Turner D, Markwald RR. Mechanisms of segmentation, septation, and remodeling of the tubular heart: endocardial cushion fate and cardiac looping. In: Harvey RP, Rosenthal N, editors. *Heart development.* San Diego: Academic Press, 1999:159 –174.
447. Gittenberger-de Groot AC, Vrancken Peeters MP, Mentink MM, Gourdie RG, Poelmann RE. Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions. *Circ Res* 1998;82:1043–1052.
448. Korenberg JR, Bradley C, Disteché C. Down syndrome: molecular mapping of the congenital heart disease and duodenal stenosis. *Am J Hum Genet* 1992;50:294 –302



449. Barlow GM, Chen XN, Shi ZY, et al. Down syndrome congenital heart disease: a narrowed region and a candidate gene. *Genet Med* 2001;3:91-101
450. Wu, J., Springett, A., Morris, J.K. Survival of trisomy 18 (Edwards syndrome) and trisomy 13 (Patau Syndrome) in England and Wales: 2004-2011. *Am J Med Genet A*. 2013;161A:2512–2518.
451. Fishler K, Koch R. Mental development in Down syndrome mosaicism. *Am J Ment Retard*. 1991; 96:345–351. [PubMed: 1836734]
452. Bhatt S, Schreck R, Graham JM, Korenberg JR, Hurvitz CG, Fischel-Ghodsian N. Transient leukemia with trisomy 21: Description of a case and review of the literature. *Am J Med Genet*. 1995; 58:310– 314. [PubMed: 8533839]
453. Papavassiliou P, York TP, Gursoy N, Hill G, Nicely LV, et al. (2009) The phenotype of persons having mosaicism for trisomy 21/Down syndrome reflects the percentage of trisomic cells present in different tissues. *Am J Med Genet A* 149A: 573–583.
454. Larsen, WJ. Development of the limbs. In: Sherman, LS.; Potter, SS.; Scott, WJ., editors. *Human embryology*. New York: Churchill Livingstone; 2001. p. 327
455. Derbent M, Saygili A, Yilmaz Z, Kervancioğlu M, Balci S, Tokel K. Co-occurrence of chromosome 22q11.2 microdeletion and trisomy 21 mosaicism. *American Journal of Medical Genetics*. 2002;112(1):99–102. [PubMed]
456. Biesecker, L. G. & Spinner, N. B. A genomic view of mosaicism and human disease. *Nature reviews. Genetics* 14, 307–320, <https://doi.org/10.1038/nrg3424> (2013).
457. Jacobs, K., Mertzaniidou, A., Geens, M., Thi Nguyen, H., Staessen, C., and Spits, C. (2014). Low-grade chromosomal mosaicism in human somatic and embryonic stem cell populations. *Nat. Commun.* 5, 4227.
458. Dolan M, Mendelsohn NJ, Pierpont ME, Schimmenti LA, Berry SA, Hirsch B. A novel microdeletion/microduplication syndrome of 19p13.13. *Genet Med*. 2010;12(8):503–511. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181e59291.
459. Souza J, Faucz F, Sotomaior V, Bonalumi FA, Rosenfeld J, Raskin S. Chromosome 19p13.3 deletion in a child with Peutz-Jeghers syndrome, congenital heart defect, high myopia, learning difficulties and dysmorphic features: clinical and molecular characterization of a new contiguous gene syndrome. *Genet. Mol. Biol.* [Internet]. 2011 [cited 2018 Jan 03] ; 34( 4 ): 557-561. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-47572011000400005&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572011000400005&lng=en). Epub Sep 16, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572011005000044>.

460. Le Meur N., Martin C., Saugier-veber P., Joly G., Lemoine F., Moirrot H. Complete germline deletion of the STK11 gene in a family with Peutz–Jeghers syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2004;12:415–418.
461. Zhao ZY, Jiang YL, Li BR, et al. A 23-nucleotide deletion in STK11 gene causes Peutz–Jeghers syndrome and malignancy in a Chinese patient without a positive family history. *Dig Dis Sci* 2017;62:3014–20.
462. Kopacova M. Peutz–Jeghers syndrome: diagnostic and therapeutic approach. *World J Gastroenterol* 2009;15:5397.
463. Jang MS, Lee YM, Ko BM, Kang G, Kim JW, Hong YH. Complete STK11 Deletion and Atypical Symptoms in Peutz-Jeghers Syndrome. *Ann Lab Med.* 2017 Sep; 37(5): 462–464.
464. Gawlik-Kuklinska K, Iliszko M, Wozniak A, Debiec-Rychter M, Kardas I, Wierzba J, Limon J. 2007. A girl with duplication 9q34 syndrome. *Am J Med Genet Part A* 143A:2019–2023.
465. Turleau C, Grouchy J, Chavin-Colin F, Roubin M, Brissaud PE, Repesse G, Safar A, Broniche P. 1975. Partial trisomy 9: A new syndrome. *Hum Genet* 29:233–241.
466. Allderdice PW, Eales B, Onyett H, Sprague W, Henderson K, Lefeuve PA, Pal G. 1983. Duplication 9q34 syndrome. *Am J Hum Genet* 35:1005–1019
467. Houdou S, Yorifugi T, Tsuruta S, Hashida K, Ohta S, Ieshima A. 1987. Distal 9q trisomy syndrome: Report of the first oriental case and literature review. *Acta Neonatal Jpn* 23: 347–352.
468. Spinner NB, Lucas JB, Poggensee M, Jacquette M, Schneider A. 1993. Duplication 9q34 qter identified by chromosome painting. *Am J Med Genet* 45:609–613
469. Amarillo IE, O'Connor S, Lee CK, Willing M, Wambach JA. 2015. De novo 9q gain in an infant with tetralogy of Fallot with absent pulmonary valve: Patient report and review of congenital heart disease in 9q duplication syndrome. *Am J Med Genet Part A* 167A:2966–2974.
470. Liu J, Hu H, Ma N, Jia Z, Zhou Y, Hu J, Wang H. A de novo duplication of chromosome 9q34.13-qter in a fetus with Tetralogy of Fallot Syndrome. *Mol Cytogenet.* 2016;259:54.
471. Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, Bertran E, Perez-Pomares JM, Diez J, Aranda S, Palomo S, McCormick F, Izpisua-Belmonte JC, de la Pompa JL. 2004. Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev* 18:99–115.

472. Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, Grossfeld PD, Srivastava D. 2005. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature* 437:270–274.
473. Bosse K, Hans CP, Zhao N, Koenig SN, Huang N, Guggilam A, LaHaye S, Tao G, Lucchesi PA, Lincoln J, Lilly B, Garg V. 2013. Endothelial nitric oxide signaling regulates Notch1 in aortic valve disease. *J Mol Cell Cardiol* 60:27–35.
474. van den Akker NM, Molin DG, Peters PP, Maas S, Wisse LJ, van Brempt R, van Munsteren CJ, Bartelings MM, Poelmann RE, Carmeliet P, Gittenberger-de Groot AC. Tetralogy of fallot and alterations in vascular endothelial growth factor-A signaling and notch signaling in mouse embryos solely expressing the VEGF120 isoform. *Circ Res.* 2007;100(6):842–849. doi: 10.1161/01.res.0000261656.04773.39.
475. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources. Firth, H.V. et al (2009). *Am.J.Hum.Genet* 84, 524-533  
(DOI: [dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.03.010](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.03.010))
476. Decipher.sanger.ac.uk. (2017). 284022 - DECIPHER v9.19. [online] Available at: <https://decipher.sanger.ac.uk/patient/284022#genotype/cnv/57745/browser> [Accessed 17 Dec. 2017].
477. Decipher.sanger.ac.uk. (2017). 266276 - DECIPHER v9.19. [online] Available at: <https://decipher.sanger.ac.uk/patient/266276#genotype/cnv/41183/browser> [Accessed 17 Dec. 2017].
478. Decipher.sanger.ac.uk. (2017). 289834 – DECIPHER v9.19. [online] Available at: <https://decipher.sanger.ac.uk/patient/289834#genotype/cnv/65246/browser> [Accessed 17 Dec. 2017].
479. GRCh37/hg19 18p11.32-11.21(chr18:136226-15198990)x1 Simple - Variation Report - ClinVar - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [cited 17 December 2017]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/443983/#supporting-observations>
480. de Grouchy J, Lamy M, Thieffry S, et al. Dysmorphie complexe avec oligophrénie: Délétion des bras courts d'un chromosome 17-18. *C R Acad Sci.* 1963;258:1098-1102.
481. Kasasbeh FA, Shawabkeh MM, Hawamdeh AA. Deletion of 18p syndrome. *Lab Med* 2011;42:436-8.

482. Wester U, Bondeson M-L, Edeby C, Annere'n G. 2006. Clinical and molecular characterization of individuals with 18p deletion: A genotype–phenotype correlation. *Am J Med Genet Part A* 140A:1164–1171.
483. Oswal N., Christov G., Sridharan S., Khambadkone S., Bull C., Sullivan I. Aberrant subclavian artery origin in tetralogy of Fallot with pulmonary stenosis is associated with chromosomal or genetic abnormality. *Cardiol. Young*. 2014;24:478–484.
484. Srebniak et al.: Prenatally diagnosed submicroscopic familial aberrations at 18p11.32 without phenotypic effect. *Molecular Cytogenetics* 2011 4:27.
485. Schaub RL, Reveles XT, Baillargeon J, Leach RJ, Cody J. (2002). Molecular characterization of 18p deletions: Evidence for a breakpoint cluster. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 4. 15-9. 10.1097/00125817-200201000-00003.
486. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S, Gu B, Hart J, Hoffman D, Hoover J, Jang W, Katz K, Ovetsky M, Riley G, Sethi A, Tully R, Villamarin-Salomon R, Rubinstein W, Maglott DR. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res*. 2015 Nov 17. PubMed PMID: 26582918.
487. Decipher.sanger.ac.uk. (2017). 284022- DECIPHER v9.19. [online] Available at:  
<https://decipher.sanger.ac.uk/patient/284022#genotype/cnv/57743/browser> [Accessed 17 Dec. 2017].
488. GRCh38/hg38 1p36.33(chr1:832679-1254039)x3 Simple - Variation Report - ClinVar - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2017 [cited 17 Dec. 2017]. Available from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/58038/#supporting-observations>
489. Korshunov A, Sycheva R, Golanov A, et al. Gains at the 1p36 chromosomal region are associated with symptomatic leptomeningeal dissemination of supratentorial glioblastomas. *Am J Clin Pathol* 2007; 127:585–590.
490. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 605557: 12/02/2016. World Wide Web URL: <https://omim.org/>
491. Decipher.sanger.ac.uk. (2017). 331008 - DECIPHER v9.19. [online] Available at:

- <https://decipher.sanger.ac.uk/patient/331008#genotype/cnv/112117/browser> [Accessed 17 Dec. 2017].
492. GRCh38/hg38 8q22.1-24.3(chr8:97382873-145070385)x3 Simple - Variation Report - ClinVar - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [cited 15 January 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/151754/#summary-evidence>
  493. Ghadimi B. M. et al. . Gain of chromosome 8q23-24 is a predictive marker for lymph node positivity in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 9, 1808–1814 (2003).
  494. Felicella MM, Hagenkord JM, Kash SF, Powers MP, Berger MS, Perry A. A common 8q (MYC) amplification detected in a multifocal anaplastic astrocytoma by SNP array karyotyping. *Clin Neuropathol.* 2012;31:210–215. doi: 10.5414/NP300484.
  495. Gelb B. D., Towbin J. A., McCabe E. R. B., Sujansky E. San Luis Valley recombinant chromosome 8 and tetralogy of Fallot: a review of chromosome 8 anomalies and congenital heart disease. *American Journal of Medical Genetics.* 1991;40(4):471–476. doi: 10.1002/ajmg.1320400420.
  496. Pickler L, Wilson R, Tsai AC-H. 2011. Revisiting recombinant 8 syndrome. *Am J Med Genet Part A* 155:1923–1929.
  497. Decipher.sanger.ac.uk. (2017). 262153 - DECIPHER v9.19. [online] Available at: <https://decipher.sanger.ac.uk/patient/262153#genotype/cnv/37515/browser> [Accessed 17 Dec. 2017].
  498. Willemsen MH, Fernandez BA, Bacino CA et al: Identification of ANKRD11 and ZNF778 as candidate genes for autism and variable cognitive impairment in the novel 16q24.3 microdeletion syndrome. *Eur J Hum Genet* 2010; 18: 429–435.
  499. Handrigan GR, Chitayat D, Lionel AC, et al Deletions in 16q24.2 are associated with autism spectrum disorder, intellectual disability and congenital renal malformation *Journal of Medical Genetics* 2013;50:163-173.
  500. GRCh38/hg38 10q26.3(chr10:133429127-133563886)x3 Simple - Variation Report - ClinVar - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [cited 15 January 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/154345/>
  501. Decipher.sanger.ac.uk. (2018). 262153 - DECIPHER v9.19. [online] Available at:

- <https://decipher.sanger.ac.uk/patient/288498#genotype/cnv/62990/browser> [Accessed 15 Jan. 2018].
502. GRCh37/hg19 6q26(chr6:161625929-161812380)x4 Simple - Variation Report - ClinVar - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [cited 15 January 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/253818/#supporting-observations>
  503. GRCh38/hg38 16p11.2-11.1(chr16:35247701-35492994)x3 Simple - Variation Report - ClinVar - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [cited 15 January 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/146744/>
  504. Lazier, Joanna et al. Prenatal Array Comparative Genomic Hybridization in Fetuses With Structural Cardiac Anomalies. *J Obstet Gynaecol Can* 2016;38:619-26.
  505. Decipher.sanger.ac.uk. (2018). 262153 - DECIPHER v9.19. [online] Available at: <https://decipher.sanger.ac.uk/patient/288804#genotype/cnv/63510/browser> [Accessed 15 Jan. 2018].
  506. Piccione M, Maresi E, Zollino M, Sanfilippo C, Seminara L, Neri G, et al. Sex reversal from functional disomy of Xp: prenatal and post-mortem findings. *Am J Med Genet*, 146A (2008), pp. 2681-2687
  507. Lachlan KL, Collinson MN, Sandford RO, van Zyl B, Jacobs PA, Thomas NS. Functional disomy resulting from duplications of distal Xq in four unrelated patients. *Hum Genet*, 115 (2004), pp. 399-408
  508. Novelli A, Bernardini L, Salpietro DC, Briuglia S, Merlino MV, Mingarelli R, et al. Disomy of distal Xq in males: case report and overview. *Am J Med Genet*, 128A (2004), pp. 165-169.
  509. Decipher.sanger.ac.uk. (2018). 262153 - DECIPHER v9.19. [online] Available at: <https://decipher.sanger.ac.uk/patient/316957#genotype/cnv/97919/browser> [Accessed 15 Jan. 2018].
  510. Weber et al.: 8p23.1 duplication syndrome: narrowing of critical interval to 1.80 Mbp. *Molecular Cytogenetics* 2014 7:94
  511. Barber JC, Rosenfeld JA, Foulds N, Laird S, Bateman MS, Thomas NS, Baker S, Maloney VK, Anilkumar A, Smith WE, Banks V, Ellingwood S, Kharbutli Y, Mehta L, Eddleman KA, Marble M, Zambrano R, Crolla JA, Lamb AN: 8p23.1 duplication syndrome; common, confirmed, and novel features in six further patients. *Am J Med Genet A* 2013, 161A:487–500.

- 512. Li T, Liu C, Xu Y, et al. Identification of candidate genes for congenital heart defects on proximal chromosome 8p. *Scientific Reports*. 2016;6:36133. doi:10.1038/srep36133.
- 513. Engelen JJ, Moog U, Evers JL, Dassen H, Albrechts JC, Hamers AJ. Duplication of chromosome region 8p23.1→p23.3: a benign variant? *Am J Med Genet* 2000;91:18-21.
- 514. tsai CH, Graw SL, McGavran L. 8p23 duplication reconsidered: is it a true euchromatic variant with no clinical manifestation. *J Med Genet*. 2002;39:769–774.
- 515. Nishida K, Tamura A, Nakazawa N, et al. The Ig heavy chain gene is frequently involved in chromosomal translocations in multiple myeloma and plasma cell leukemia as detected by in situ hybridization. *Blood*. 1997;90(2):526–534.
- 516. Wang L, et al. Novel somatic and germline mutations in intracranial germ cell tumours. *Nature*. 2014;511:241–245. doi: 10.1038/nature13296
- 517. Saliba, J., Saint-Martin, C., Di Stefano, A., Lenglet, G., Marty, C., Keren, B., Pasquier, F., Della Valle, V., Secardin, L., Leroy, G., Mahfoudhi, E., Grosjean, S., and 19 others. Germline duplication of ATG2B and GSKIP predisposes to familial myeloid malignancies. *Nature Genet*. 47: 1131-1140, 2015.

## **10. Anexos**

### **10.1. PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO DE AMPLIFICACIÓN MÚLTIPLE DE SONDAS DEPENDIENTES DE LIGACIÓN (MLPA).**

#### **1. Propósito**

Establecer los pasos a seguir para realizar amplificación múltiple dependiente de ligación de sondas (MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification).

#### **2. Paso a paso**

##### **DIA 1**

##### **Paso 1. Preparar las muestras**

- Realizar dilución (si es necesario) del ADN de las muestras y 2 controles (positivos y/o negativos) por ensayo, hasta obtener una concentración final de 100ng/μl.
- Los controles negativos se definen como muestras de ADN humano que no tengan alteraciones en las regiones de interés.

##### **Paso 2. Preparar mix de hibridación**

- Adicionar por cada muestra:
  - 1.5μl SALSA probemix (tapa negra)
  - 1.5μl MLPA buffer (tapa amarilla)
- Preparar considerando una pérdida total de volumen por pipeteo del 10%



### Paso 3. Desnaturalizar el ADN

- Tomar 3µl de muestra y adicionar 2µl de agua grado biología molecular
- Calentar por 5 minutos a 98°C
- Bajar la temperatura a 25°C
- Continuar cuando la temperatura de los tubos haya bajado

### Paso 4. Hibridar las sondas al ADN

- Adicionar 3µl del mix de hibridación a cada muestra
- Incubar 1 minuto a 95°C
- Incubar 16-20 horas a 60°C

## DIA 2

### Paso 5. Preparar el mix Ligasa

- Adicionar por cada muestra:
  - 25µl agua ultrapura
  - 3µl Ligase Buffer A (Transparente)
  - 3µl Ligase Buffer B (Blanco)
  - 1µl Ligase-65 (Verde)
- Preparar considerando una pérdida total de volumen por pipeteo del 10%
- Preservar en hielo hasta su uso

### Paso 6. Preparar el mix Polimerasa

- Adicionar por cada muestra:
  - 7.5µl agua
  - 2µl PCR Primer mix (café)
  - 0.5µl SALSA Polymerase (naranja)

- Preparar considerando una pérdida total de volumen por pipeteo del 10%
- Preservar en hielo hasta su uso

#### Paso 7. Ligar las sondas hibridadas

- Programar el termociclador a 54°C
- Cuando los tubos estén a 54°C adicionar 32µl del mix Ligasa
- Incubar 15 minutos a 54°C
- Inactivar la Ligasa: 5 minutos a 98°C
- Pausar la temperatura en 20°C

#### Paso 8. Amplificar las sondas ligadas

- Adicionar 10µl del mix Polimerasa (20°C)
- Iniciar la PCR
  - 35 Ciclos: 30 seg – 95°C; 30 seg 60°C; 60 seg 72°C
  - 20 minutos a 72°C
  - Pausa a 15°C

#### Paso 9. Preparar el estándar de tamaño

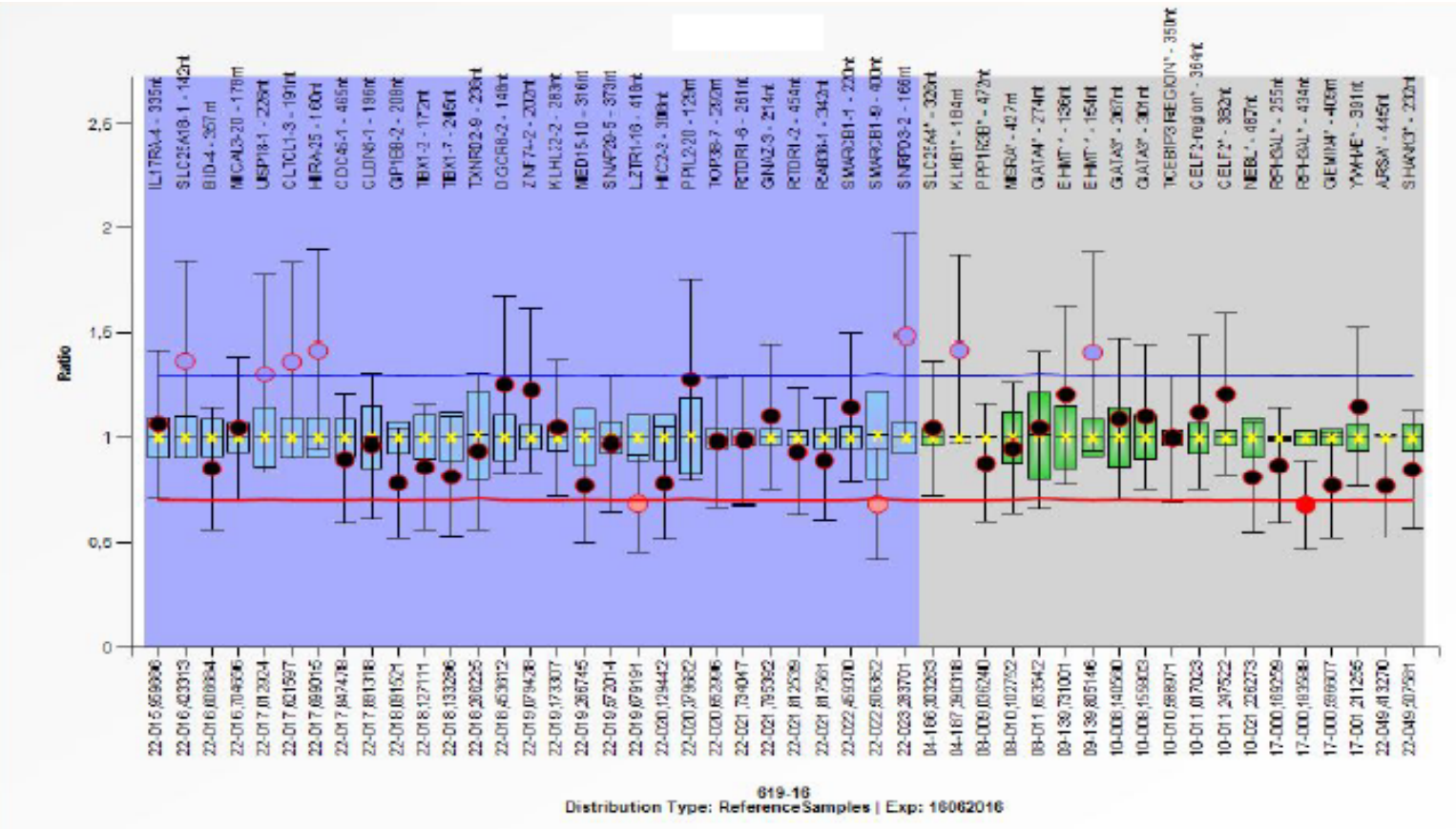
- Preparar el estándar, adicionando por cada muestra:
  - 9µl de Formamida
  - 0.2µl de LIZ 600
  - Preparar considerando una pérdida total de volumen por pipeteo del 10%
- Dispensar 9.2µl del estándar en una placa de 96 pozos
- Dispensar 1µl del producto de MLPA en cada pozo con el estándar
- Calentar durante 5 min a 86°C, y enfriar por 5 min a 4°C

Paso 10. Realizar electroforesis capilar

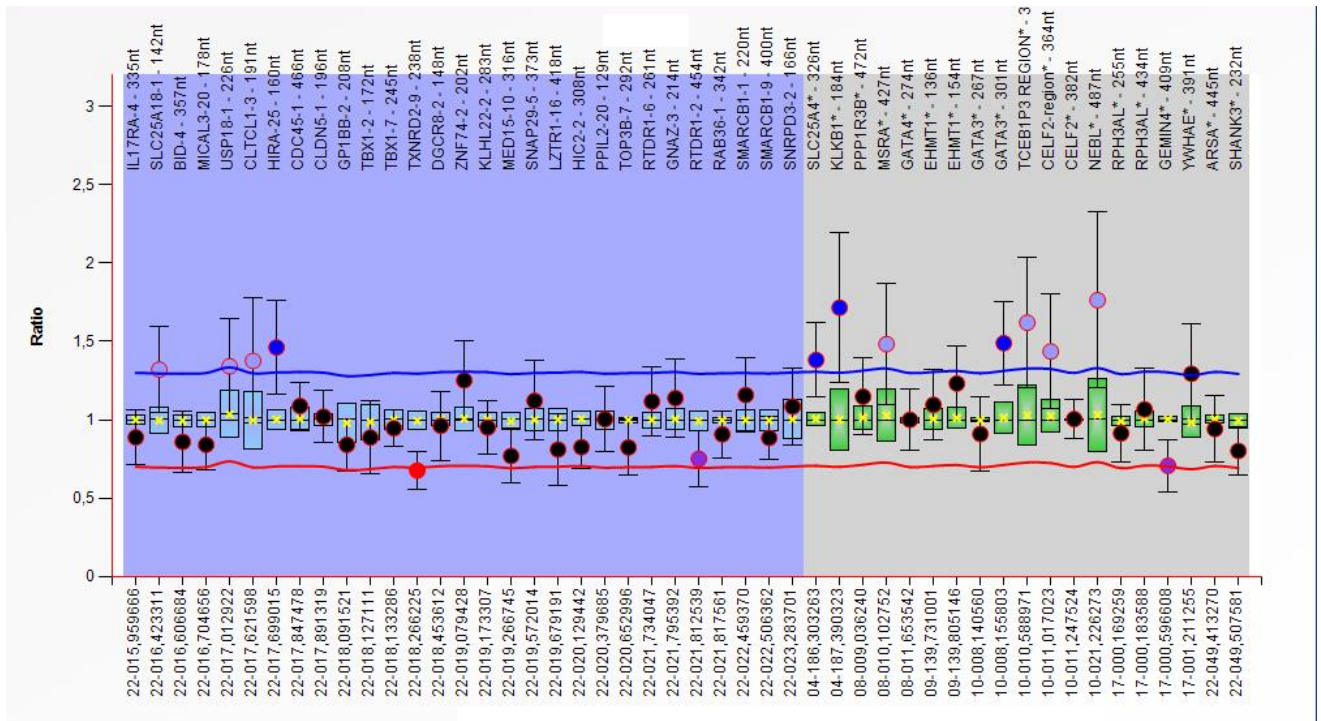
- Ajustar la electroforesis de acuerdo a los siguientes parámetros:
- Modo de corrido: análisis de fragmentos
- Voltaje de inyección: 1.6kV
- Tiempo de inyección: 15 segundos
- Voltaje de corrida: 15kV
- Tiempo de corrida: 1800 segundos (30 minutos)
- Temperatura: 60°C
- Polímero: POP 7

# 10.2. IMÁGENES RESULTADOS AMPLIFICACIÓN MÚLTIPLE DE SONDAS DEPENDIENTES DE LIGACIÓN (MLPA).

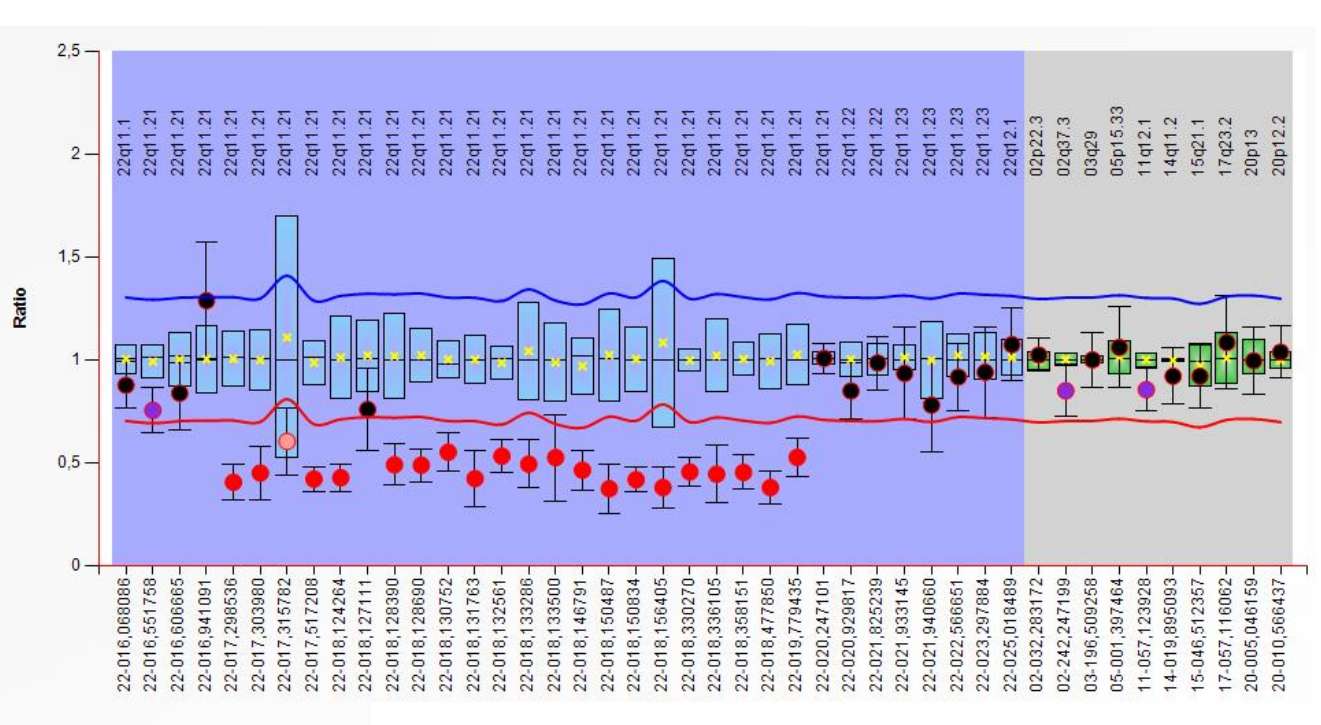
- Paciente 01



- Paciente 02**

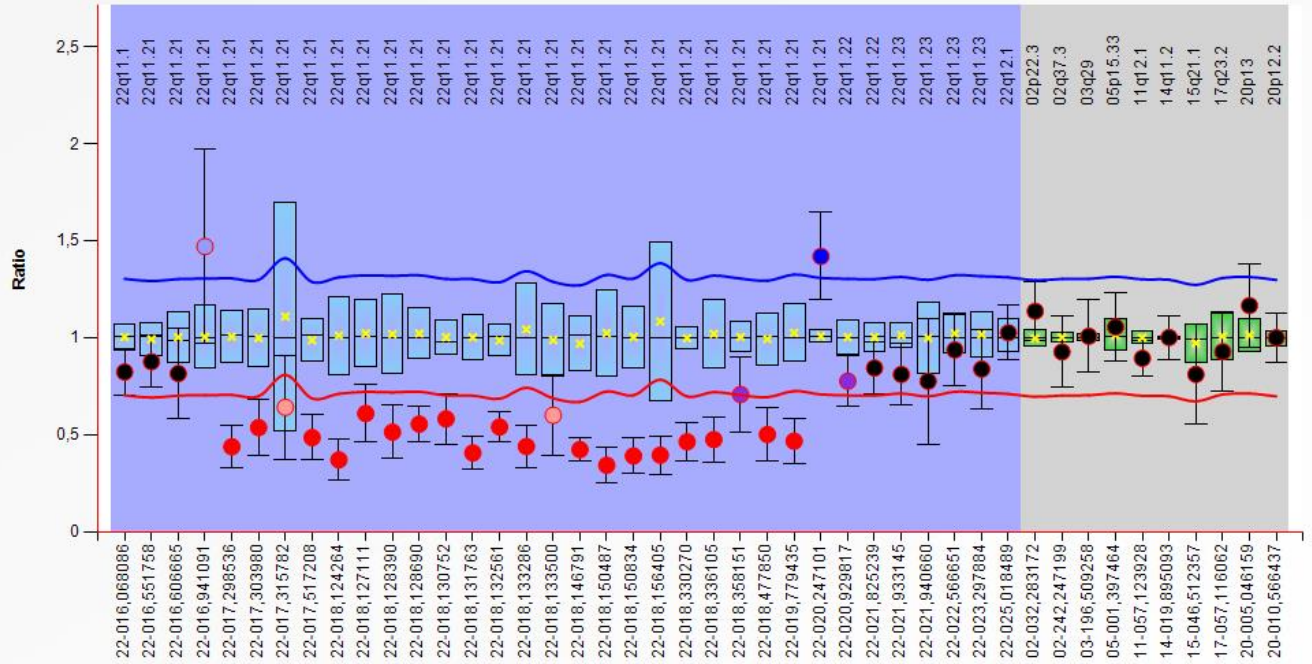


- Paciente 03**

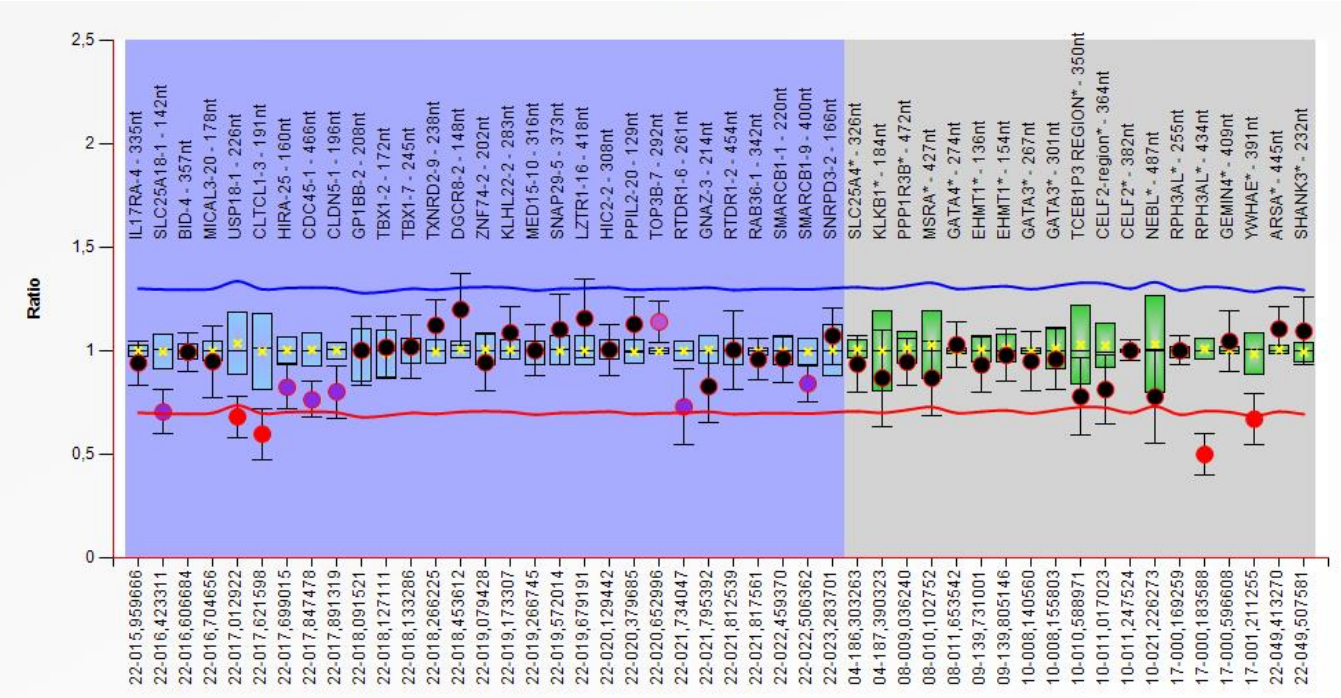




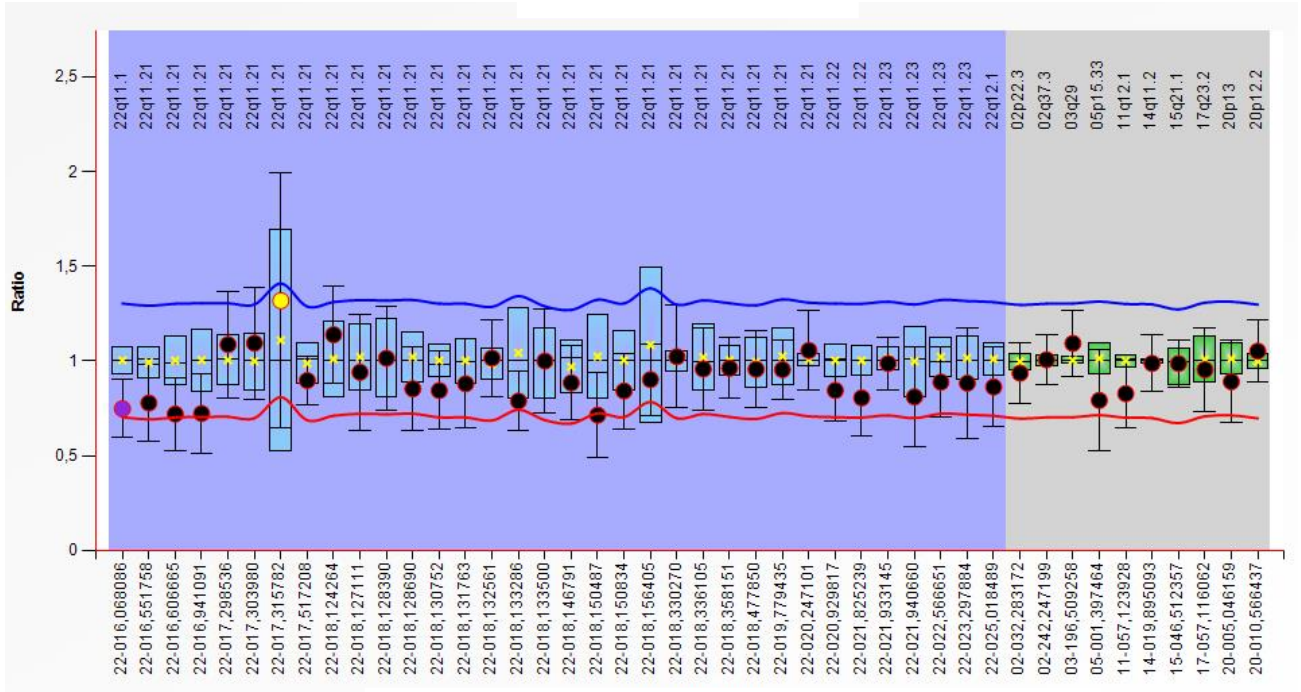
- **Paciente 04**



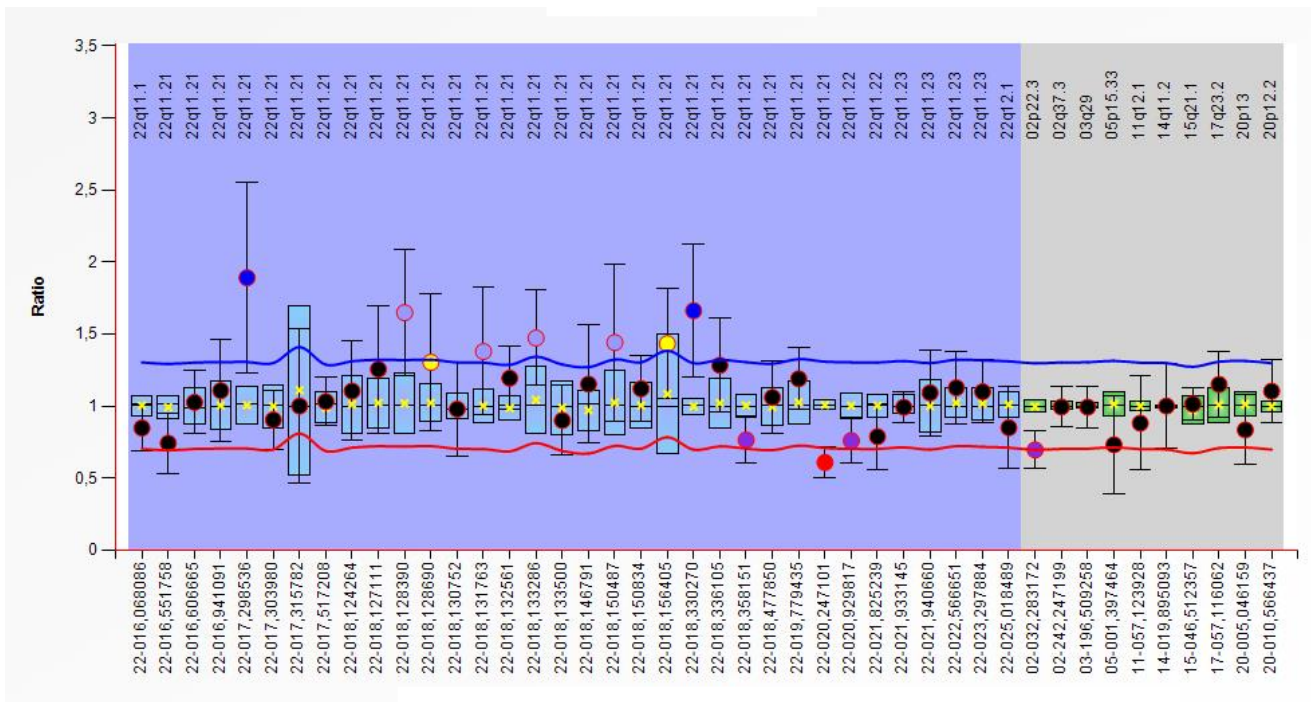
- **Paciente 05**



- Paciente 06**

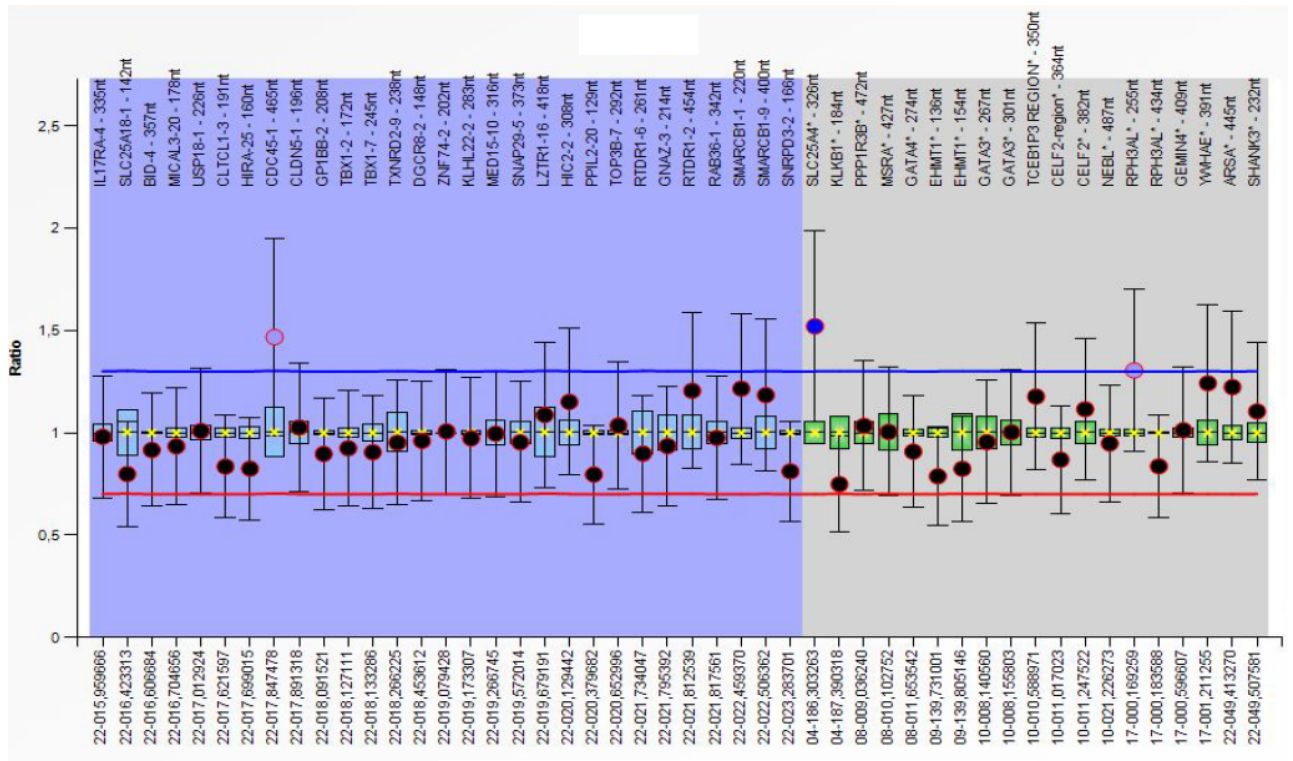


- Paciente 07**

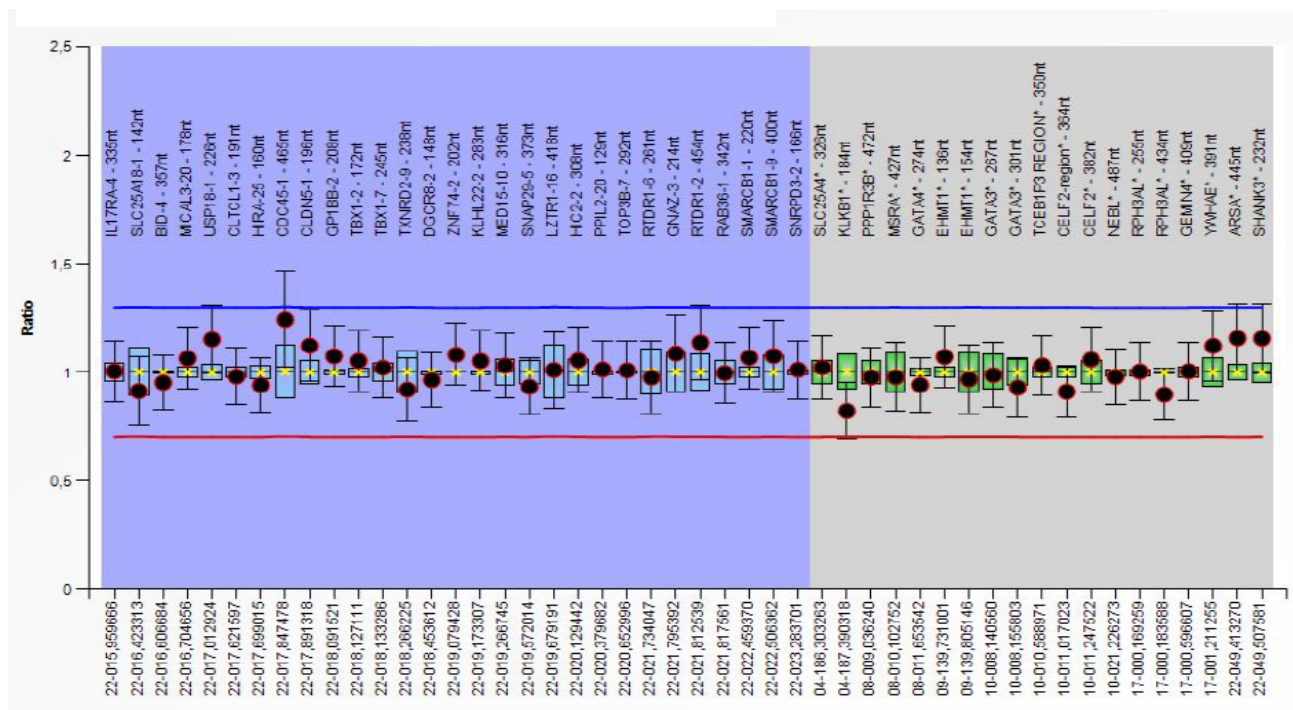




- Paciente 08**

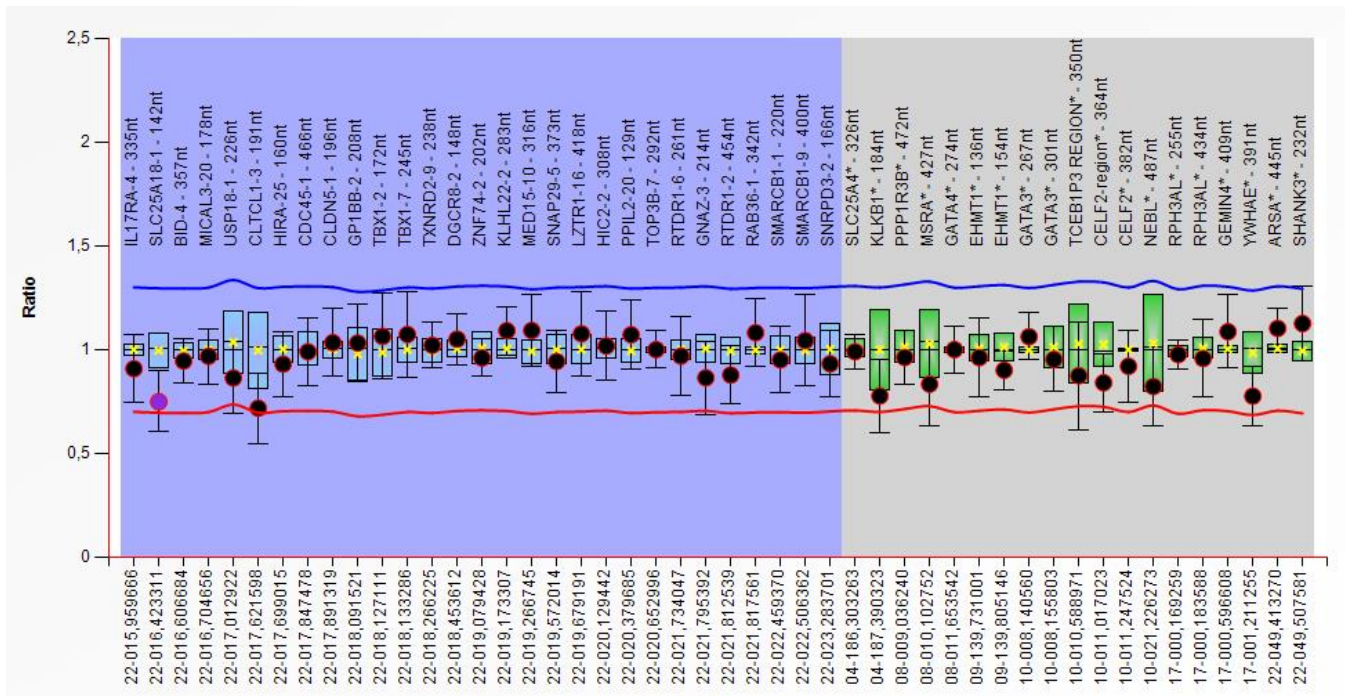


- Paciente 09**

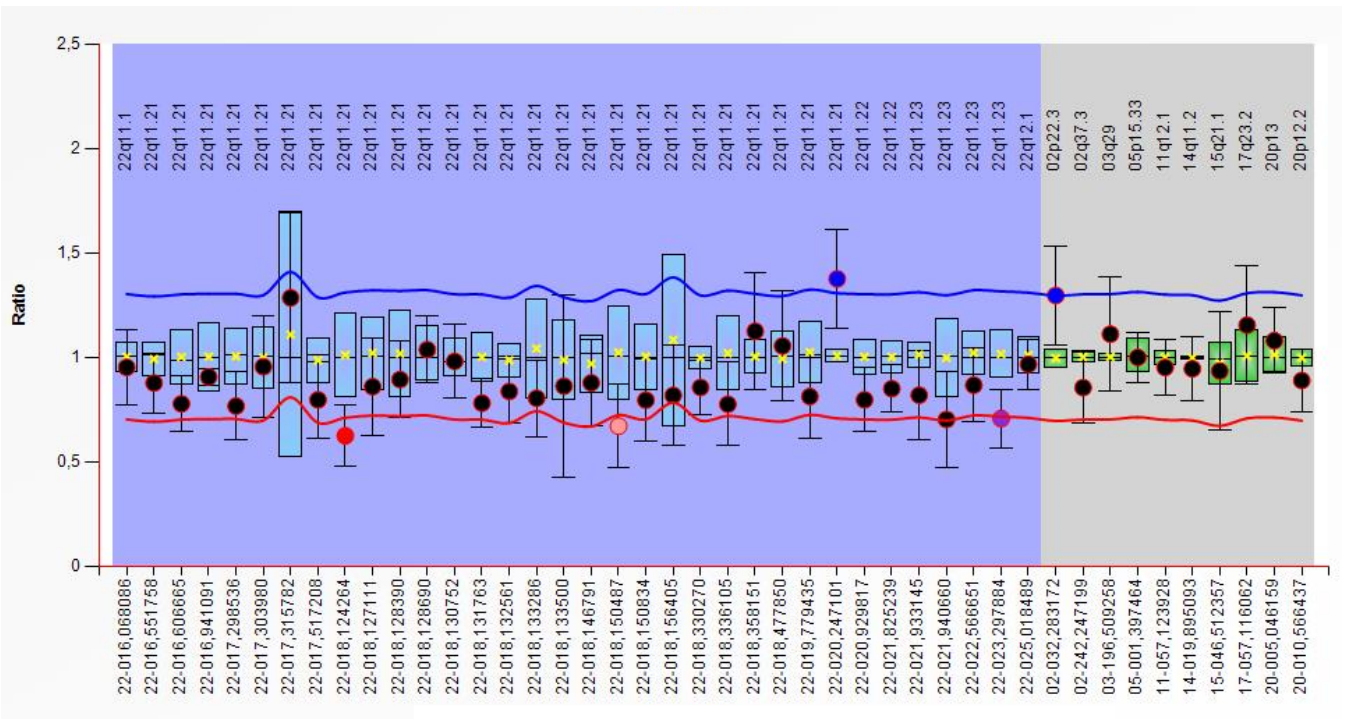




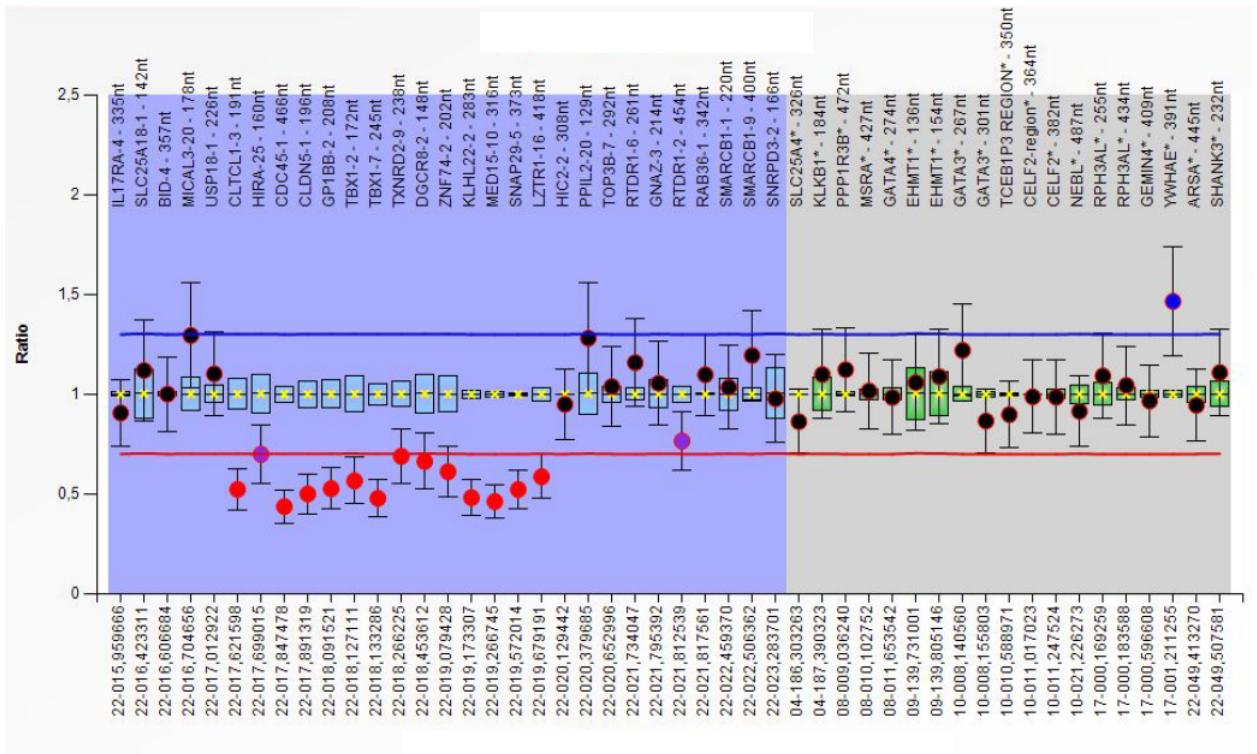
- Paciente 10



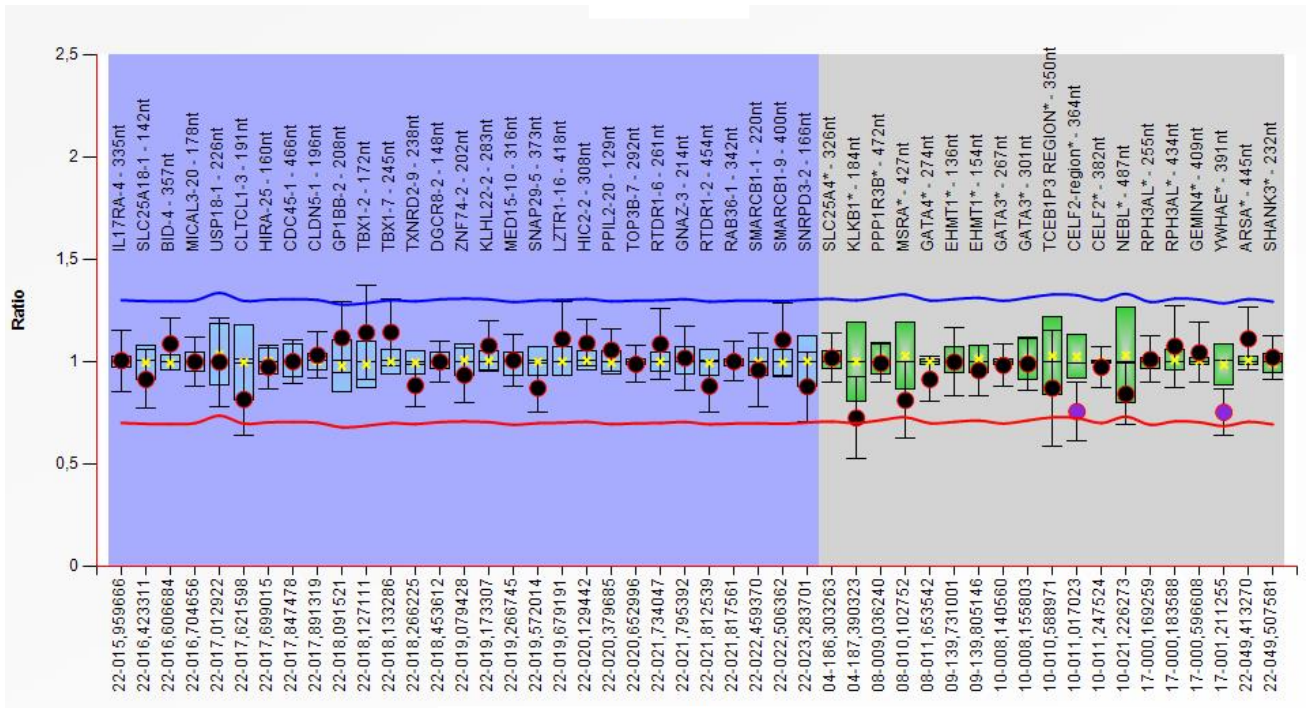
- Paciente 11



- Paciente 12**

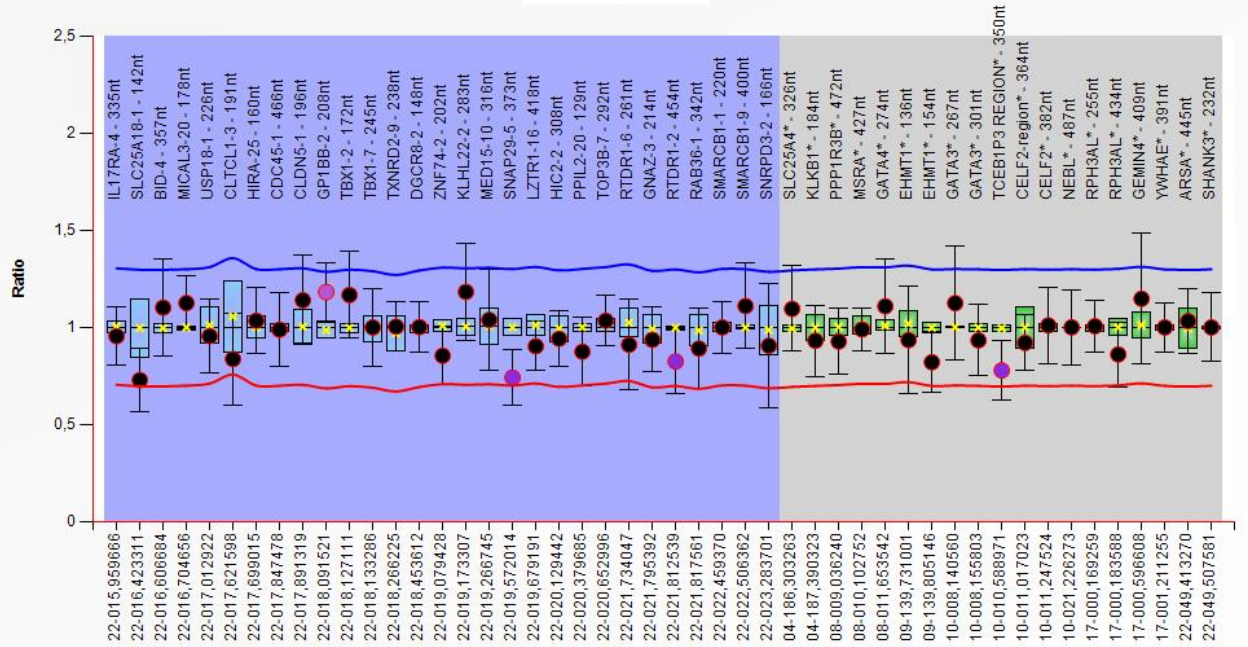


- Paciente 13**

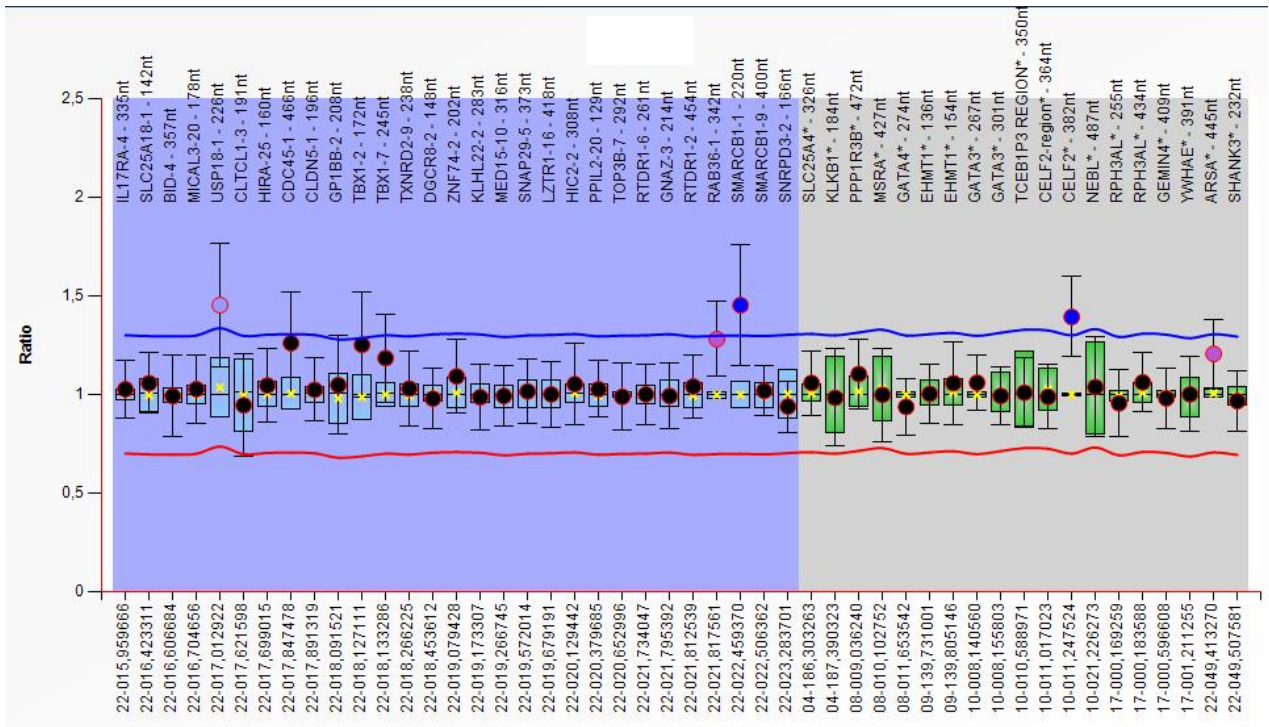




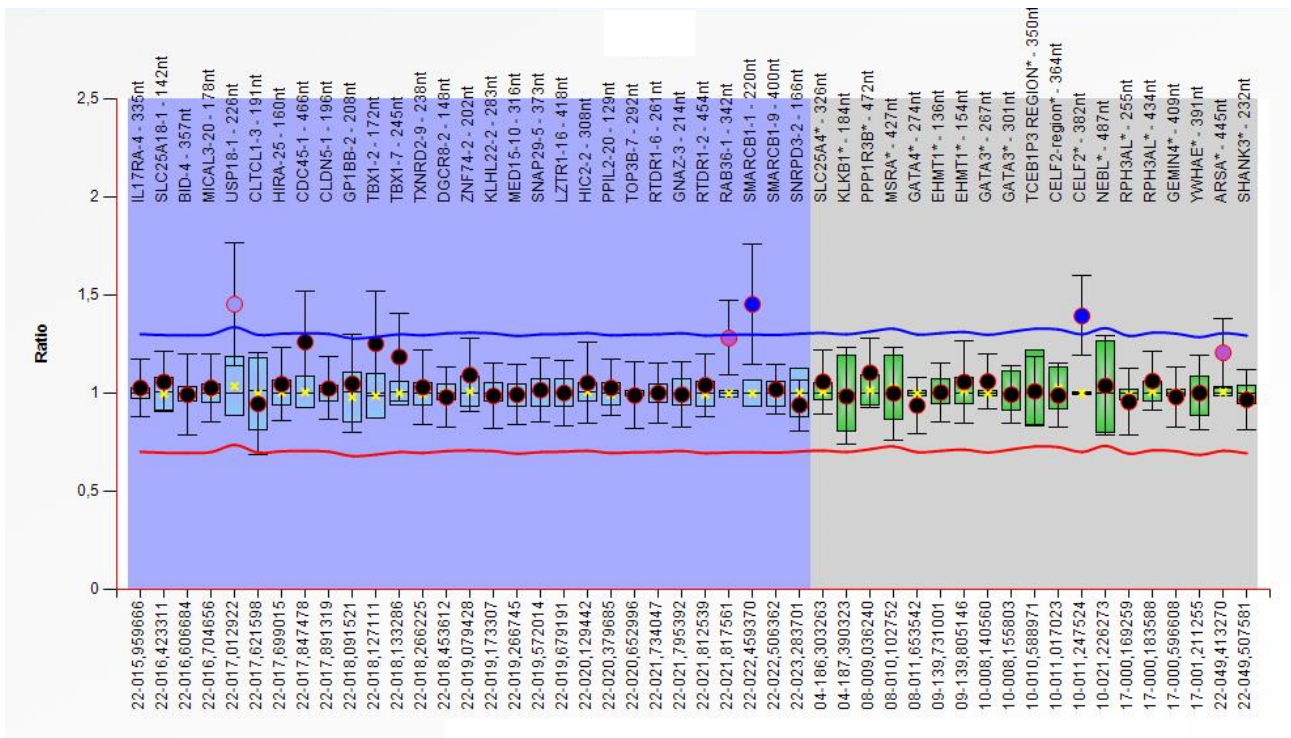
- **Paciente 14**



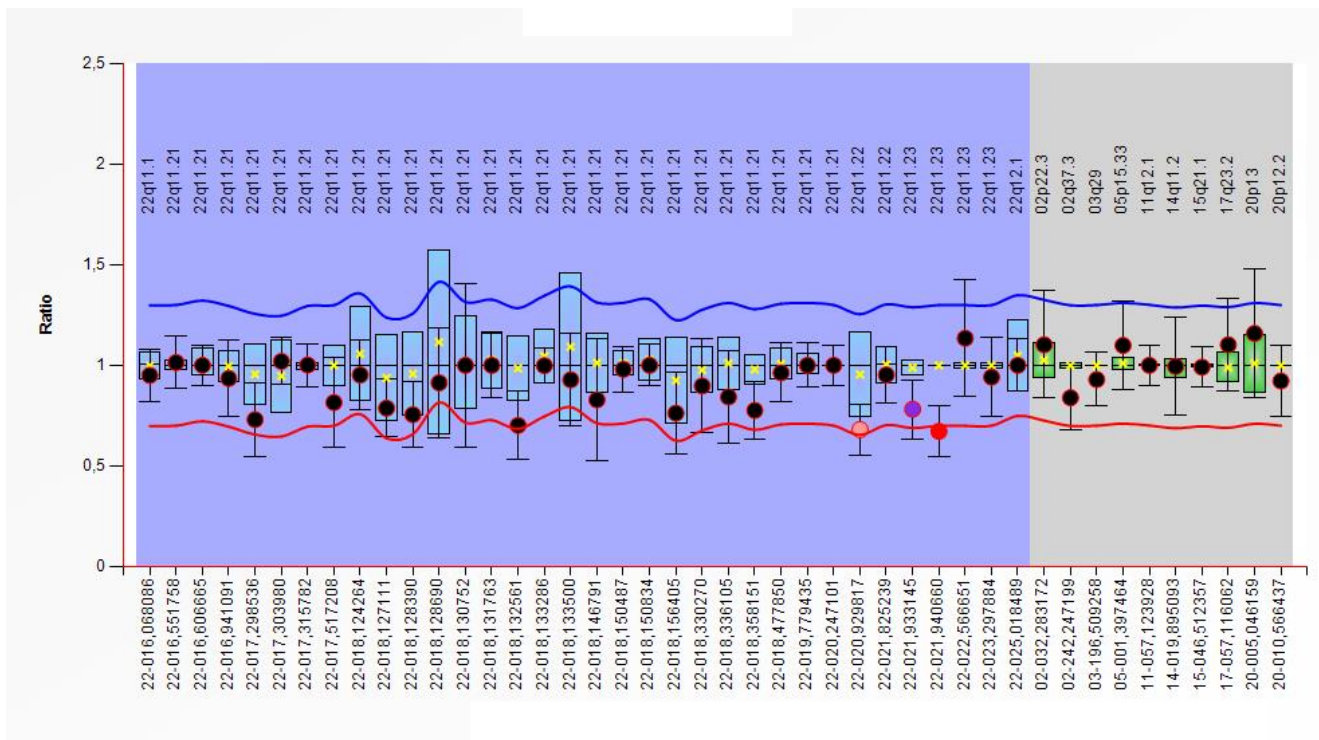
- **Paciente 16**



- **Paciente 18**

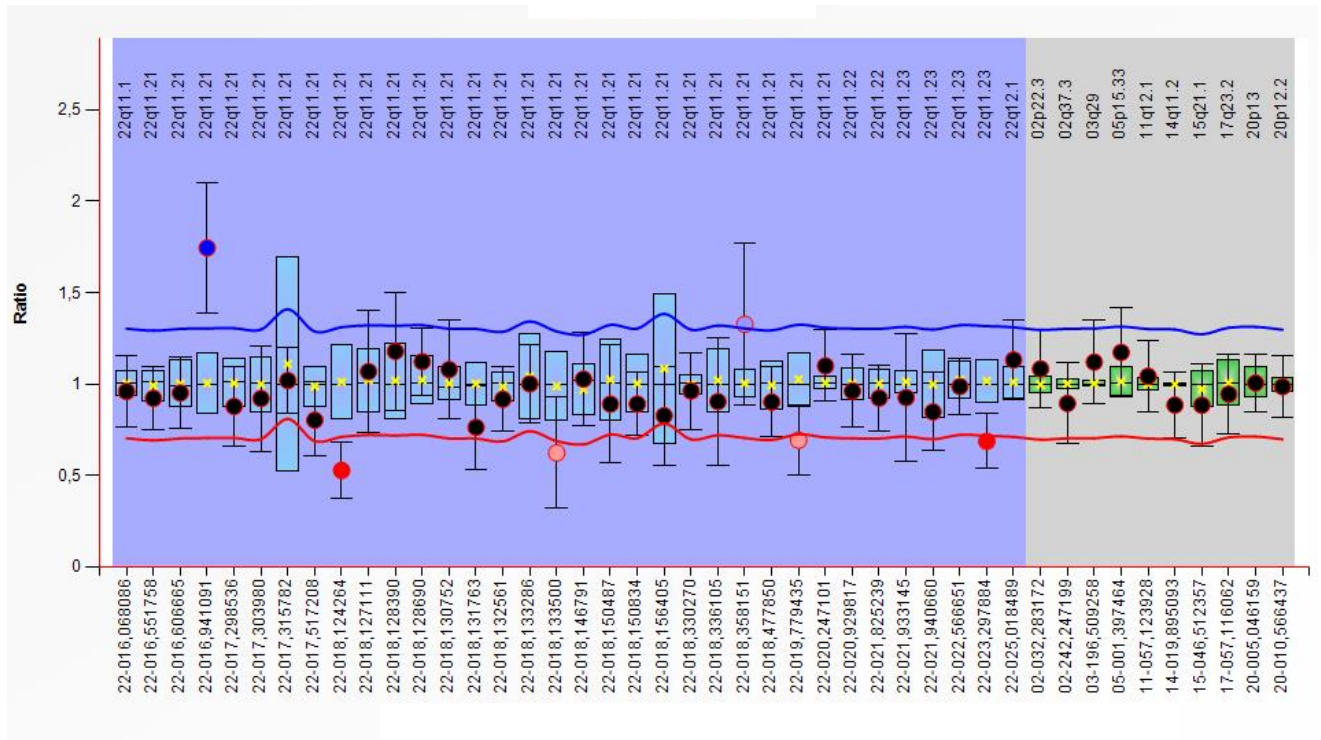


- **Paciente 19**

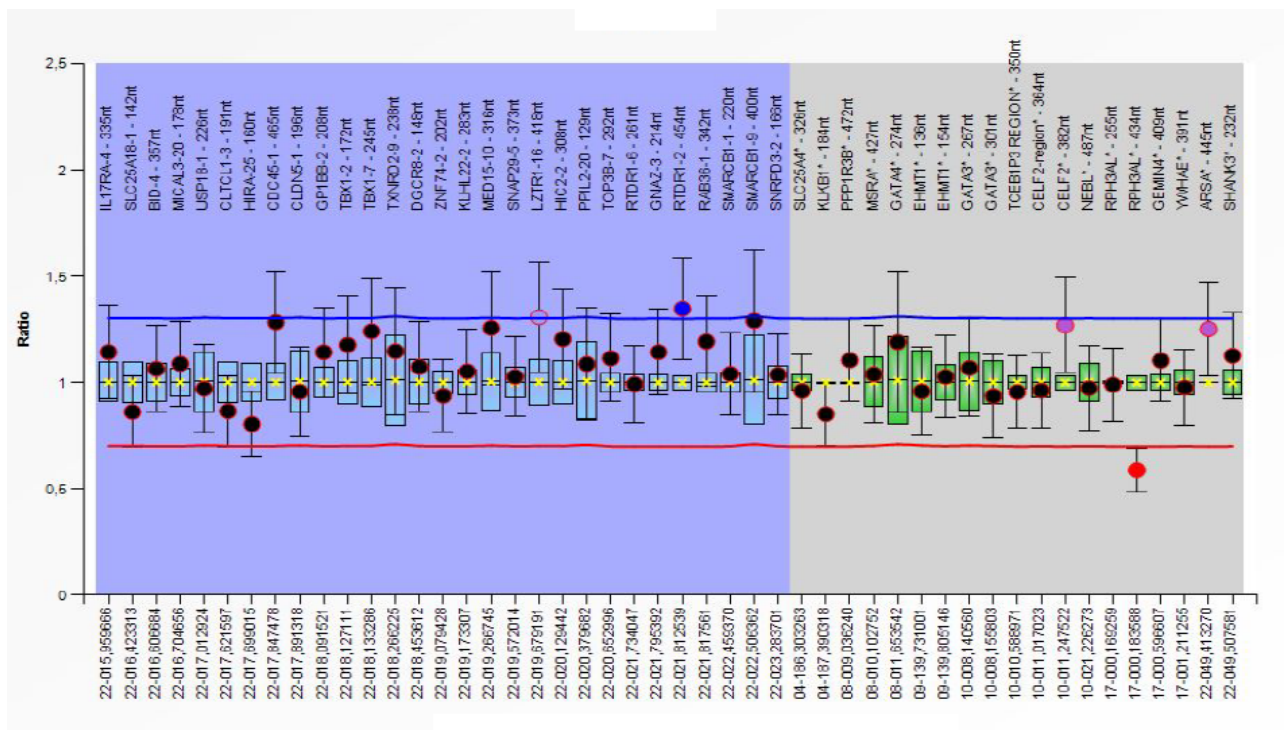




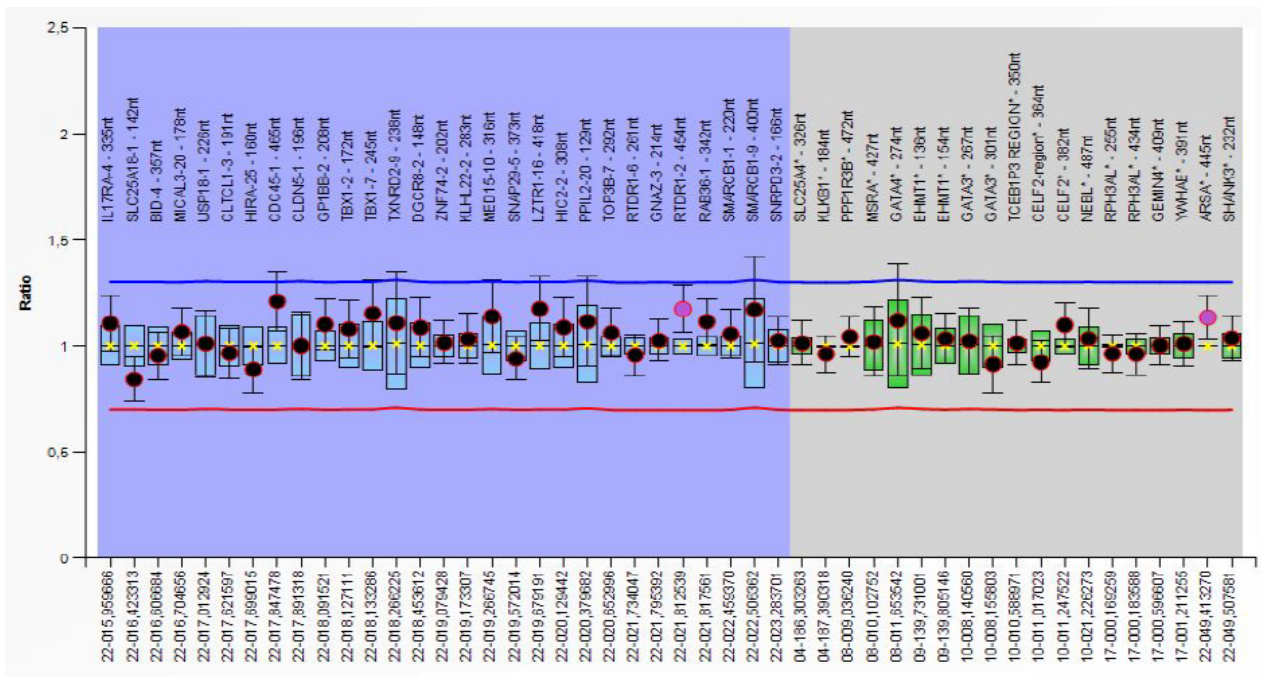
- Paciente 20**



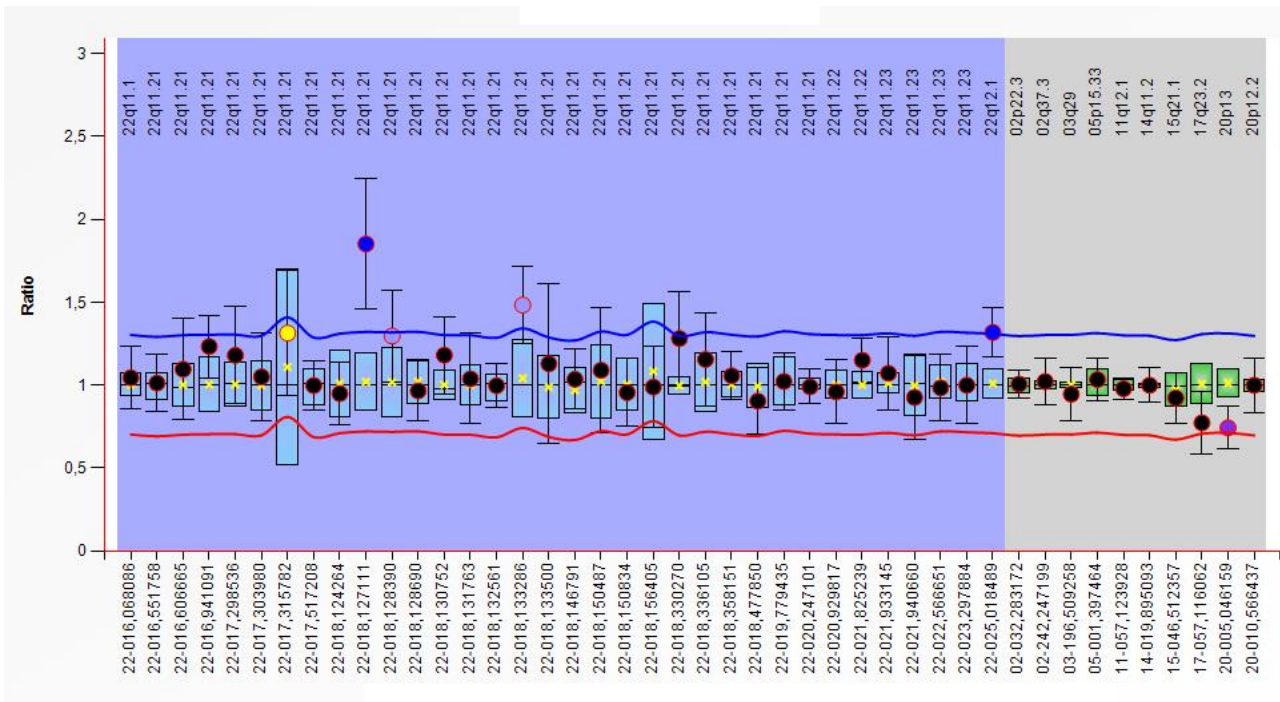
- Paciente 22**



- **Paciente 23**

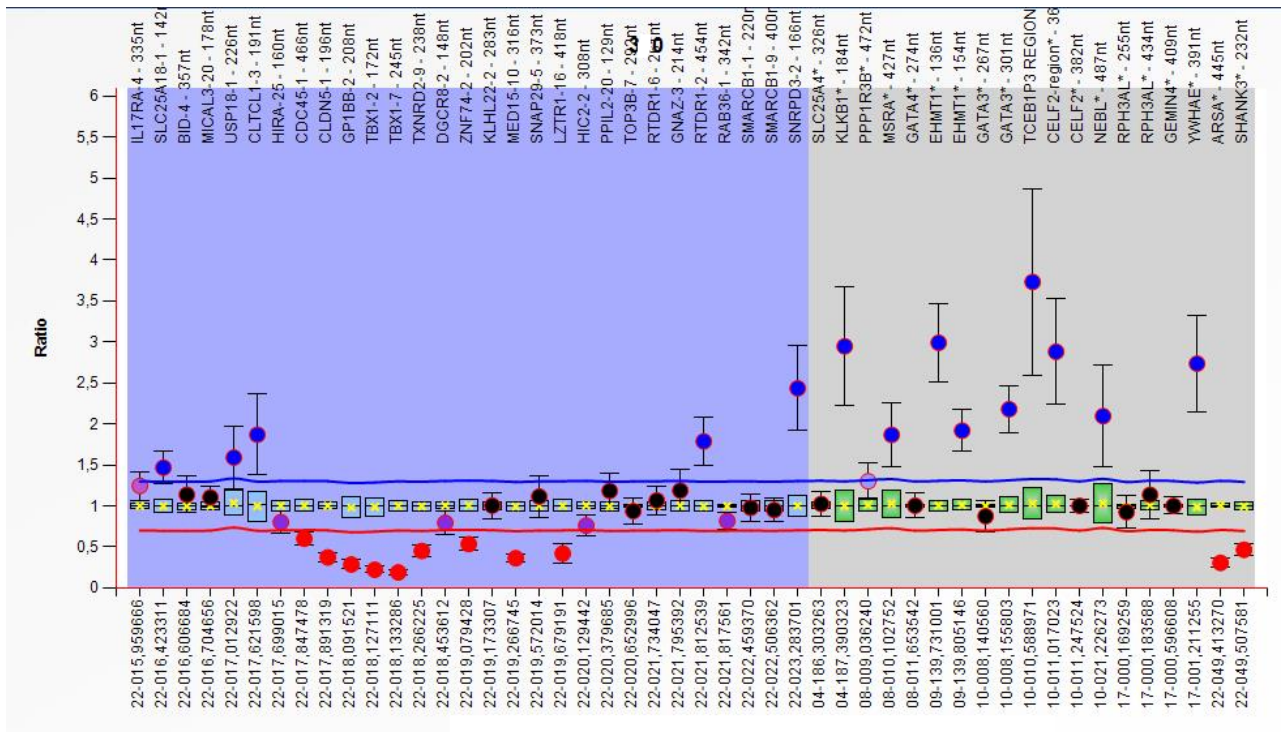


- **Paciente 24**

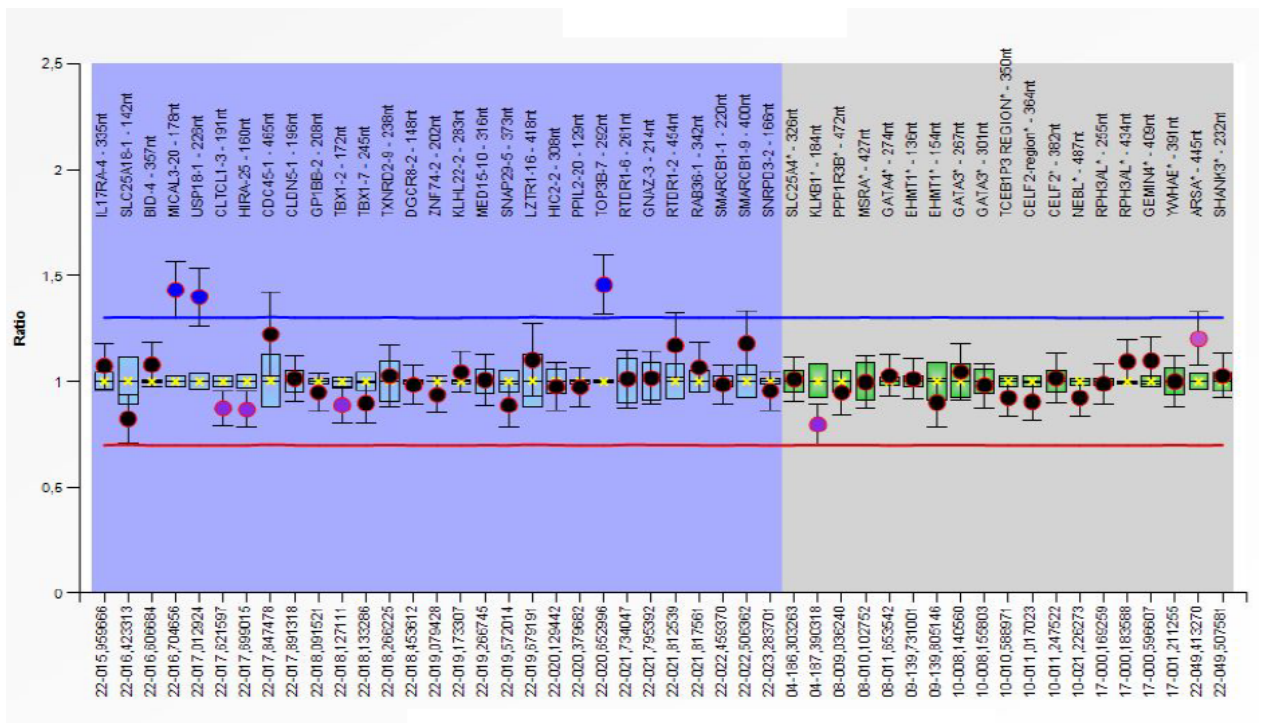




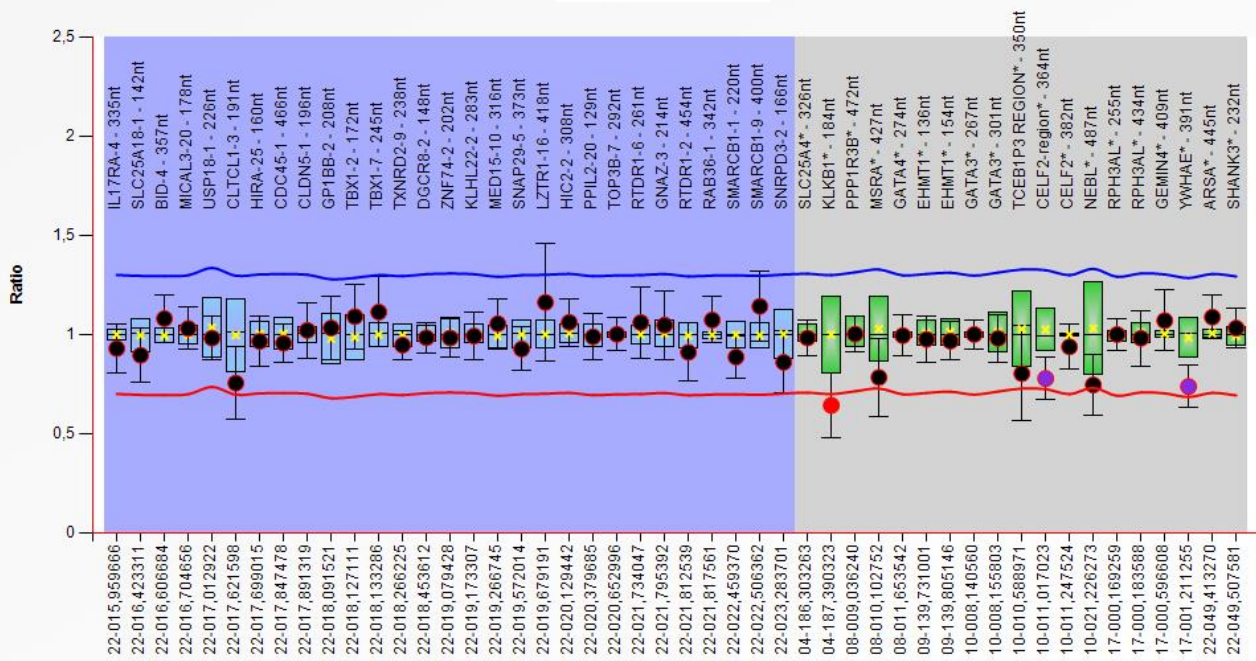
- **Paciente 25**



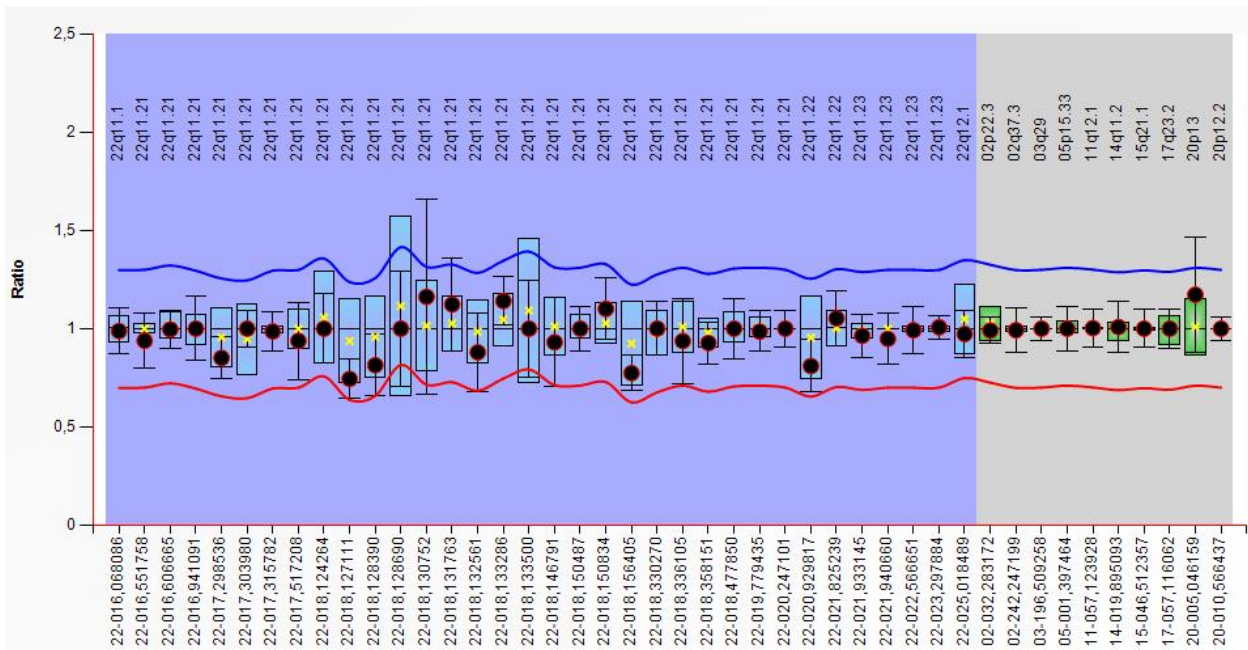
- **Paciente 26**



- **Paciente 27**

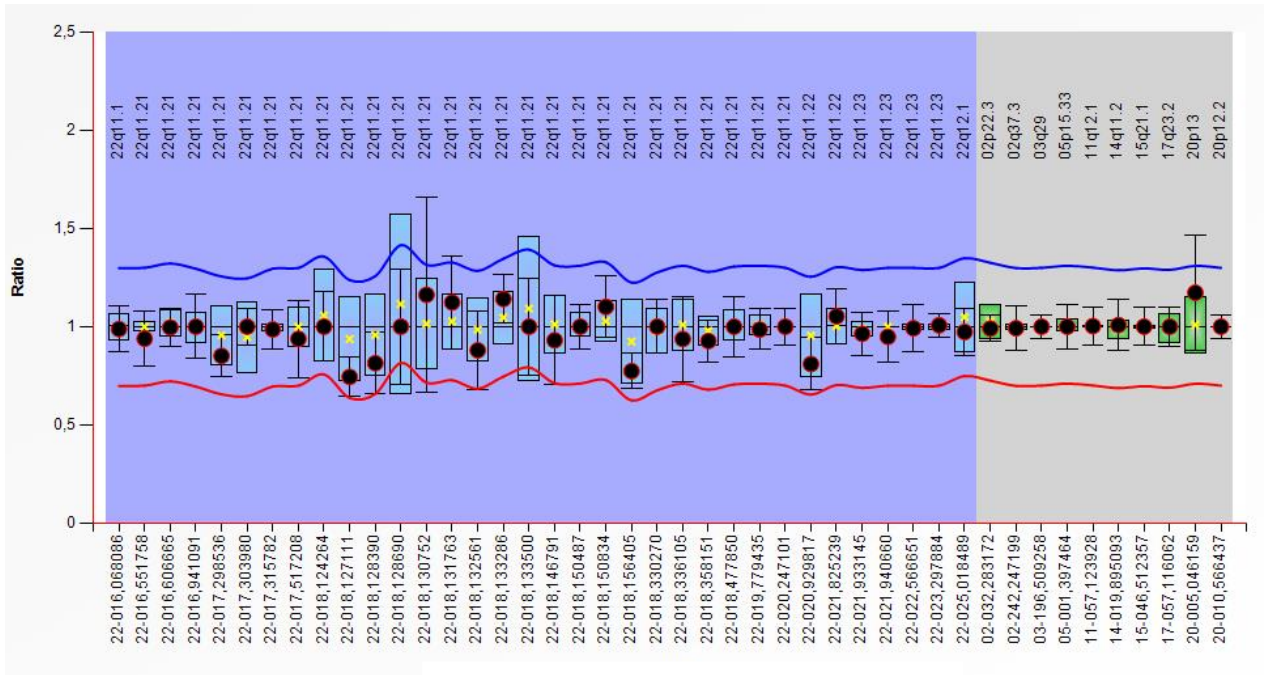


- **Paciente 28**

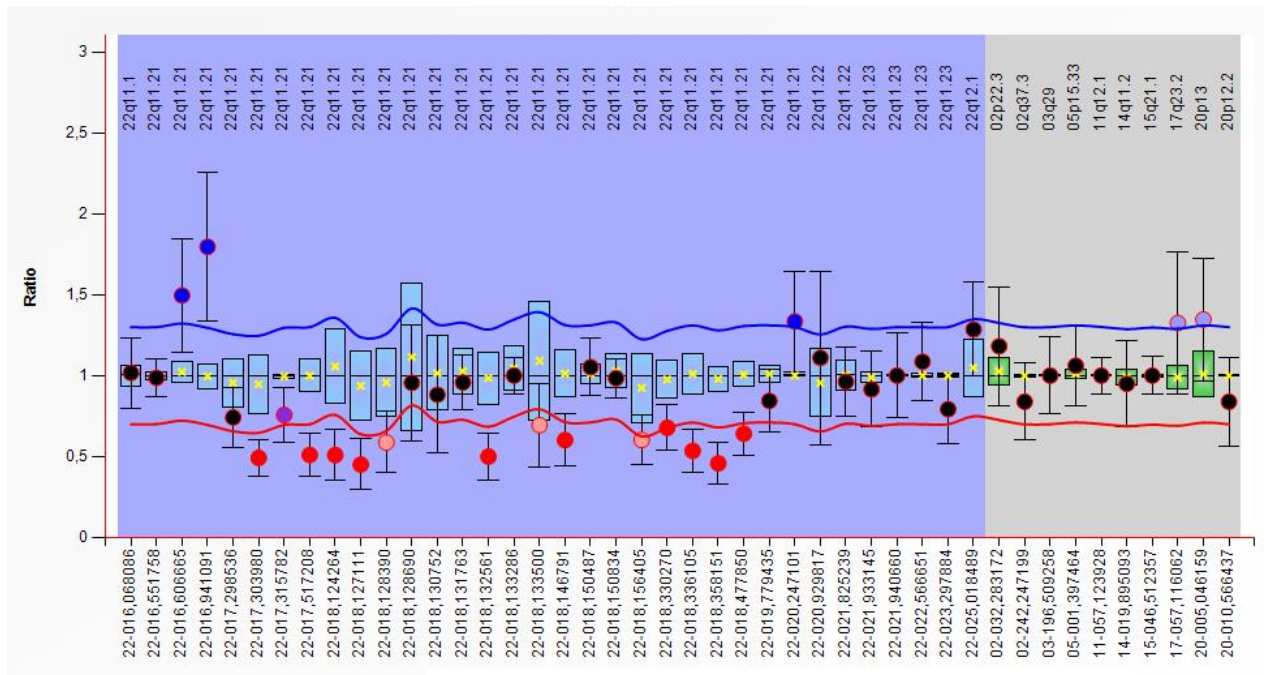




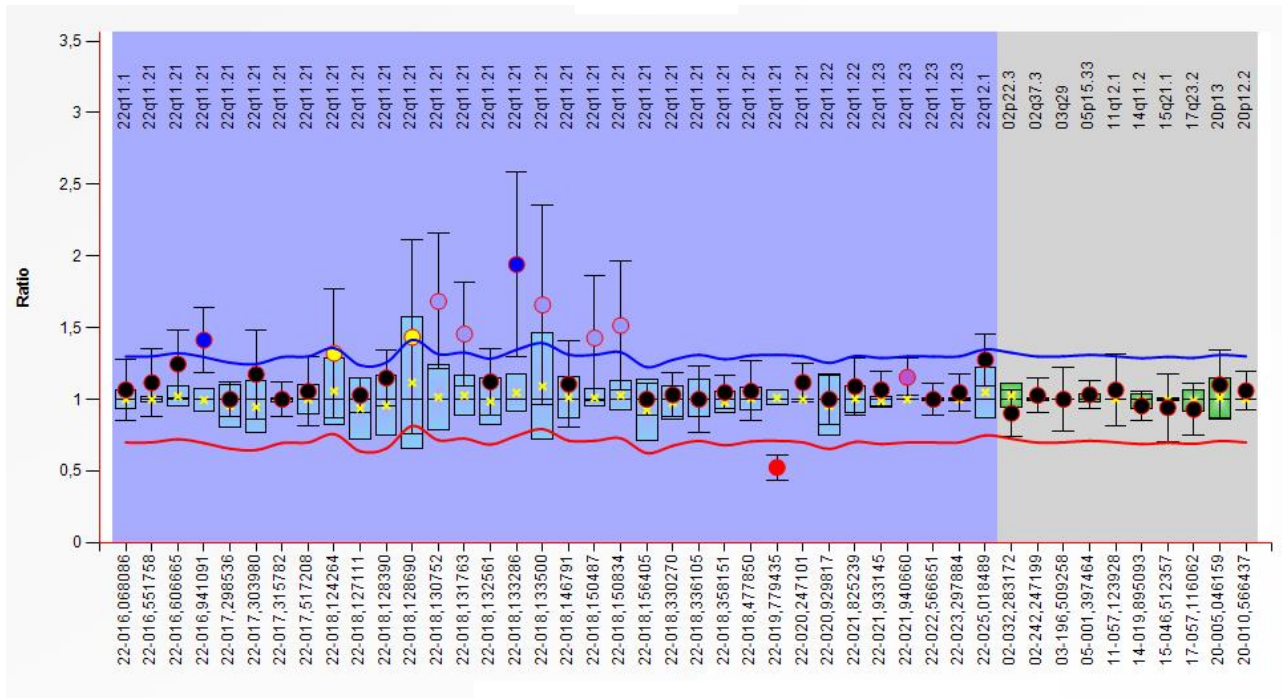
- **Paciente 29**



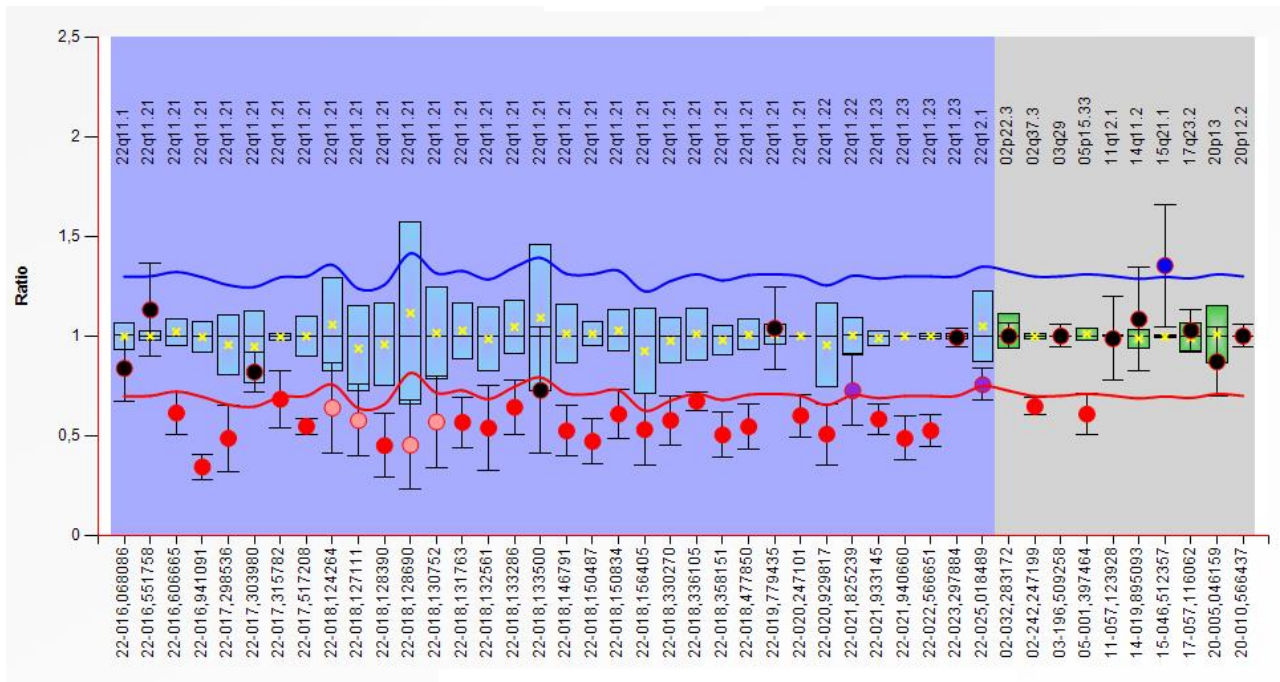
- **Paciente 31**



- **Paciente 32**



- **Paciente 33**



- **Paciente 35**

